



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rita Isabel Fernandes de Oliveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novos horizontes terapêuticos para o cancro da mama: papel da medicina de precisão”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Marta Costa, da Doutora Ana Catarina Pinto, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rita Isabel Fernandes de Oliveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novos horizontes terapêuticos para o cancro da mama: papel da medicina de precisão”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Marta Costa, da Doutora Ana Catarina Pinto, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Rita Isabel Fernandes de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015238592, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novos horizontes terapêuticos para o cancro da mama: papel da medicina de precisão” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 11 de setembro de 2020.

Rita Isabel Fernandes de Oliveira

(Rita Isabel Fernandes de Oliveira)

## Agradecimentos

Chegando à reta final deste maravilhoso percurso, torna-se inevitável agradecer a todos aqueles que nele participaram e contribuíram para que este objetivo se pudesse concretizar. Assim, quero, desde já, expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam nesta jornada.

À minha orientadora, a Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, pelo apoio que me deu, pela sua sapiência, disponibilidade, suporte científico e carinho.

A todos os elementos da Farmácia São Martinho, por todo o apoio que me deram, por me terem feito sentir parte integrante da equipa, por todos os ensinamentos que me transmitiram e pelo carinho que tiveram comigo durante a minha passagem na farmácia.

A todos os elementos do grupo de Investigação e Inovação da Bluepharma<sup>®</sup>, mas em especial à Doutora Ana Catarina Pinto e ao Doutor António Lucas Nunes, pelo seu apoio, disponibilidade e coordenação científica.

À minha mãe e ao meu irmão, os alicerces fundamentais para que este “edifício” se pudesse erguer. Agradecer pelo carinho, pelo amor sem limites e pelo apoio em todos os momentos. Sem eles, este caminho não teria sido possível.

Às minhas tartarugas ninja, pela sua paciência sem limites, pelas gargalhadas, pelo apoio e por esta jornada que partilhámos juntas.

Aos meus padrinhos (Inês e André), por me terem acolhido tão bem, por todo o seu carinho, apoio e pela amizade sincera que criámos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao seu corpo docente pelas ferramentas que me deram e que contribuíram de forma ímpar para a minha formação académica e me permitiam moldar a chave que será usada na abertura das portas do futuro.

A todos, um obrigado do fundo do coração.

May the road rise to meet you.  
May the wind be always at your back.  
May the sun shine warm on your face, the rains fall  
soft upon your fields, and, until we meet again ...  
may God hold you softly in the palm of His hand.

Irish blessing, copyright 1967 Bollind, Inc., Boulder, CO 80302

# Índice

## Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	10
2. A Farmácia São Martinho.....	10
2.1. Localização .....	10
2.2. Espaço físico da farmácia.....	10
2.3. Serviços disponibilizados.....	11
2.4. Equipa .....	12
3. Análise SWOT .....	12
3.1. Forças .....	13
3.1.1. Equipa técnica .....	13
3.1.2. Trabalho de <i>backoffice</i> .....	13
3.1.3. Autonomia na realização de tarefas .....	14
3.1.4. Aconselhamento farmacêutico .....	14
3.1.5. Medição de parâmetros analíticos .....	14
3.1.6. Preparação de manipulados.....	15
3.2. Fraquezas .....	15
3.2.1. Integração recente de um grupo de compras.....	15
3.2.2. Dificuldade inicial na associação dos nomes comerciais aos princípios ativos .....	16
3.2.3. Desconhecimento das várias referências de produtos .....	16
3.3. Oportunidades .....	16
3.3.1. Sifarma 2000® .....	16
3.3.2. Formação contínua.....	16
3.4. Ameaças .....	17
3.4.1. Medicamentos esgotados.....	17
3.4.2. Farmácias envolventes e espaços de venda de MNSRM.....	17
3.4.3. Pandemia da COVID-19.....	18
4. Considerações Finais .....	19
Referências Bibliográficas .....	20
ANEXO .....	21
Caso Prático 1 .....	21
Caso Prático 2 .....	21

## Parte II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas.....	24
1. Introdução.....	25
2. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A. ....	26
2.1. Localização e breve contextualização evolutiva .....	26
2.2. Equipa – Estrutura funcional .....	26
3. Análise SWOT .....	26
3.1. Forças .....	27
3.1.1. Metodologia <i>Kaizen</i> ™ .....	27
3.1.2. Reunião de planeamento semanal.....	28
3.1.3. Equipa técnica .....	28
3.1.4. Atribuição de um projeto sob forma de desafio .....	28

3.1.5. Atribuição de uma orientadora .....	29
3.1.6. Reunião de acompanhamento semanal.....	29
3.2. Fraquezas .....	29
3.2.1. Duração do estágio .....	29
3.3. Oportunidades .....	30
3.3.1. Sessões de formação.....	30
3.3.2. Reuniões presenciais com a orientadora .....	30
3.4. Ameaças.....	31
3.4.1. Teletrabalho devido à COVID-19.....	31
3.4.2. Formações remotas.....	31
4. Considerações Finais .....	32
Referências Bibliográficas .....	33

### **Parte III – Novos horizontes terapêuticos para o cancro da mama: papel da medicina de precisão**

Lista de Abreviaturas.....	35
Resumo.....	37
Abstract.....	38
1. Introdução.....	39
2. Cancro da mama.....	39
2.1. Epidemiologia.....	40
2.2. Fisiopatologia .....	41
2.3. Fatores de risco .....	42
2.3.1. Idade.....	42
2.3.2. Fatores de risco reprodutivo: Idade da menarca e da menopausa .....	43
2.3.3. Idade na 1ª gravidez.....	43
2.3.4. História familiar .....	43
2.3.5. Exposição à radiação.....	44
2.3.6. Estilo de vida.....	44
2.3.7. Contraceptivos orais.....	46
2.3.8. Terapêutica de reposição hormonal .....	47
3. Caracterização dos subtipos moleculares de cancro da mama .....	48
3.1. Luminal A.....	48
3.2. Luminal B .....	48
3.3. Enriquecido em HER2 (HER2+).....	49
3.4. Subtipo basal.....	50
3.5. Baixo em Claudina.....	51
4. Diagnóstico e tratamento do cancro da mama – atuais limitações .....	51
5. Biomarcadores moleculares de cancro da mama e respetiva terapêutica direcionada.....	52
5.1. Inibidores das cinases 4/6 dependentes de ciclina .....	52
5.2. Inibidores da via PI3K/Akt/mTOR .....	53
5.3. Inibidores da via Ras/Raf/MEK/ERK .....	55
5.4. Inibidores da PARP .....	55
6. Testes moleculares.....	56
6.1. Sequenciação de nova geração .....	56
6.1.1. Sequenciação da totalidade do genoma.....	57
6.1.2. Sequenciação da totalidade do exoma.....	57

6.1.3. Análise de todo o transcriptoma .....	58
6.1.4. Sequenciação direcionada .....	58
6.2. Assinaturas de expressão génica.....	58
6.2.1. MammaPrint (70-gene assay) .....	59
6.2.2. Oncotype Dx™ .....	59
6.2.3. Prediction Analysis for Microarrays (PAM50) (Prosigna).....	60
6.2.4. MapQuant Dx™ .....	60
6.2.5. Breast Cancer Index (Theros).....	60
7. Genética e genómica na monitorização do efeito terapêutico e prognóstico .....	61
7.1. DNA tumoral circulante .....	61
7.2. Células tumorais circulantes e células tumorais disseminadas.....	62
8. Medicina de precisão .....	63
8.1. Medicina de precisão e radiosensibilidade .....	63
8.2. Rastreio baseado no risco na era da medicina de precisão .....	64
8.3. O papel das técnicas de análise de imagem na medicina de precisão .....	66
9. Atuais limitações da medicina de precisão .....	67
10. Conclusão e perspetivas futuras.....	68
Referências Bibliográficas .....	69
Webgrafia.....	97



# **Parte I**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária (Farmácia São Martinho)**

**Estágio sob a orientação da Dra. Marta Costa**

## **Lista de Abreviaturas**

**DCI** – Denominação Comum Internacional

**FSM** – Farmácia São Martinho

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MSRM** – Medicamento Sujeito a Receita Médica

**OTC** – Over The Counter

## **1. Introdução**

No âmbito da unidade Estágio Curricular, inserida no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), realizei, de 6 de janeiro a 16 de março e de 3 de agosto a 28 de agosto, estágio na Farmácia São Martinho (FSM), sob orientação da Dra. Marta Costa.

Com este estágio que marca a transição de um ensino essencialmente preparatório para um ensino prático foi-me possível aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos durante o meu percurso académico, tendo constituído um elemento chave para completar a minha formação enquanto profissional de saúde. Este estágio veio consolidar em mim a responsabilidade social e profissional do farmacêutico, o impacto significativo que a atividade tem junto da população e o rigor e excelência profissional que devem reger esta atividade de saúde pública.

O presente relatório de estágio consiste numa análise segundo o modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) do estágio curricular realizado, uma importante ferramenta de planeamento estratégico.

## **2. A Farmácia São Martinho**

### **2.1. Localização**

A FSM está localizada na Rua da Escola Agrícola, nº9, em São Martinho do Bispo, pertencente ao concelho e distrito de Coimbra. Esta farmácia pertence ao grupo Salrifarma e tem a Dra. Marta Costa como diretora técnica.

A FSM tem uma localização central na freguesia, encontrando-se junto de uma escola primária e de uma dependência da Caixa Geral de Depósitos, bem como nas proximidades do ISCAC. Dada a sua localização no coração da freguesia, serve uma população bastante diversificada, em termos de faixa etária, bem como no respeitante às classes sociais e profissionais. Não obstante, o bolo maior dos clientes é residente na região e pertence a uma faixa etária mais avançada.

### **2.2. Espaço físico da farmácia**

De forma a garantir a qualidade do serviço prestado à população, as farmácias devem dispor de condições e instalações que lhes permitam assegurar uma adequada conservação e segurança dos medicamentos, bem como acessibilidade e privacidade dos utentes. Neste contexto, a FSM, localizada no rés-de-chão de uma moradia, é constituída por uma sala de

atendimento ao público, espaço de receção e armazenamento, instalações sanitárias, gabinete de atendimento personalizado, laboratório para a preparação de manipulados e por um gabinete administrativo.

O espaço de atendimento ao público possui 3 postos de atendimento em balcão contínuo, cada um dos quais dotado do *software* Sifarma 2000®. Este espaço encontra-se privilegiado por uma forte componente de iluminação natural, o que o torna acolhedor e tem os produtos organizados por marcas, em função do fim a que se destinam, fazendo usufruto de gôndolas e de expositores “*over the counter*” (OTC) para destaque dos produtos.

O gabinete de atendimento personalizado é um espaço de maior privacidade onde é realizada a medição de parâmetros analíticos (tensão arterial, glicémia capilar, colesterol total), bem como outros serviços diferenciadores (administração de vacinas e injetáveis, consultas de nutrição e de osteopatia, sessões de acupuntura, podologia e rastreios auditivos).

A área de receção de encomendas está devidamente equipada com computadores, leitores óticos, impressora e impressora de código de barras. Este posto permite a elaboração e envio de encomendas aos armazenistas, controlo das reservas e gestão dos *stocks*, bem como dos prazos de validade.

O espaço de armazenamento é de acesso restrito aos funcionários e nele são manualmente arrumados os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e alguns medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) em armário de gavetas. A arrumação é feita pelo princípio da segregação de formas farmacêuticas. Assim, existem divisórias diferenciadas destinadas à arrumação dos comprimidos, de xaropes e suspensões orais, de soluções e produtos de aplicação tópica, de champôs, de pós e granulados, de pomadas/cremes, de psicotrópicos, de produtos de uso veterinário, de supositórios/produtos de aplicação vaginal e de tiras e lancetas para medição da glicémia capilar. Os comprimidos são arrumados por ordem alfabética do princípio ativo, enquanto que as restantes formas farmacêuticas são arrumadas por ordem alfabética do nome comercial. Para além do armário de gavetas, existe ainda neste espaço um frigorífico para refrigeração dos produtos de frio, prateleiras para arrumação dos excedentes e armário próprio para arrumação de produtos de aplicação nasal, oftálmica e auricular.

### **2.3. Serviços disponibilizados**

No que respeita aos serviços disponibilizados à população, é possível mencionar a determinação de parâmetros analíticos, preparação individualizada da medicação, preparação de medicamentos manipulados, administração de vacinas e injetáveis, consultas de nutrição, consultas de osteopatia, sessões de acupuntura e podologia, rastreios auditivos, entre outros.

Esta farmácia coloca ainda ao dispor da população a recolha de medicamentos fora de prazo pela Valormed, bem como recolha de radiografias, o que surge como uma medida de proteção ambiental e de saúde pública.

## 2.4. Equipa

A farmácia possui 4 colaboradoras na sua equipa técnica que asseguram o funcionamento da instituição no horário das 8h30 às 20h, de segunda-feira a sábado, estando aberta 24h no dia de serviço escalado na rotatividade das farmácias do distrito de Coimbra. A equipa é constituída por três farmacêuticas e uma técnica auxiliar de farmácia, dispondo ainda de uma auxiliar de limpeza, tal como sistematizado na Tabela I.

**Tabela I.** Recursos humanos da Farmácia São Martinho e respetivas funções

<b>Nome</b>	<b>Categoria Profissional</b>
Dra. Marta Costa	Diretora técnica
Dra. Márcia Neves	Farmacêutica Adjunta substituta
Dra. Sara Almeida	Farmacêutica
Fátima Rodrigues	Técnica Auxiliar de Farmácia
Dona Graça	Auxiliar de limpeza

## 3. Análise SWOT

Uma análise SWOT tem como objetivo a identificação de forças (*Strengths*) e fraquezas (*Weakness*) do objeto de análise, bem como das oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) do meio que lhe é envolvente. Os pontos fortes (Forças) e os pontos fracos (Fraquezas) são identificados por avaliação interna, relativamente às estratégias a longo prazo, enquanto que as oportunidades e as ameaças são identificadas a partir de uma avaliação externa, expondo fatores que estão para lá do controlo imediato mas que não podem ser ignorados. Desta análise resultam as eventuais vantagens competitivas a proteger e as eventuais desvantagens a eliminar (1). A Tabela 2 compila as principais forças, fraquezas, oportunidades e ameaças identificadas.

**Tabela 2.** Análise SWOT– Identificação de Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

<b>Forças</b>	<b>Fraquezas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Equipa técnica</li><li>• Trabalho de <i>backoffice</i></li><li>• Autonomia na realização de tarefas</li><li>• Aconselhamento farmacêutico</li><li>• Medição de parâmetros analíticos</li><li>• Preparação de manipulados</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Integração recente de um grupo de compras</li><li>• Dificuldade inicial na associação dos nomes comerciais aos princípios ativos</li><li>• Desconhecimento das várias marcas de produtos</li></ul>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sifarma 2000®</li><li>• Formação contínua</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Medicamentos esgotados</li><li>• Farmácias envolventes e espaços de venda de MNSRM</li><li>• Pandemia da COVID-19</li></ul>

### **3.1. Forças**

#### **3.1.1. Equipa técnica**

A equipa técnica da FSM é uma equipa constituída por funcionárias com vários anos de casa que conquistaram já, junto da população, um estatuto quase de membro da família. Esta proximidade à população aumenta a confiança dos utentes no aconselhamento prestado, garantindo um maior sucesso das vendas cruzadas que têm vindo a aumentar nos últimos anos como consequência do aparecimento dos genéricos e drástica diminuição no preço dos medicamentos.

Cada elemento tem responsabilidades definidas, o que permite uma gestão e otimização das tarefas a serem realizadas, fulcral para um bom funcionamento da instituição. Esta organização, bem como o espírito de equipa e entreaajuda que se fizeram sentir, foram fundamentais para que rapidamente me sentisse acolhida e integrada, e, assim, estivesse confortável na colocação de dúvidas que me permitiram expandir o meu leque de conhecimentos, evoluir enquanto profissional de saúde e adaptar-me à prática da atividade profissional.

#### **3.1.2. Trabalho de *backoffice***

Os primeiros tempos do estágio em farmácia comunitária foram maioritariamente passados na realização de tarefas de *backoffice*. Estas tarefas são importantíssimas já que, através delas, me foi possível familiarizar com a grande diversidade de referências existentes

numa farmácia, bem como começar a associar os princípios ativos aos nomes comerciais dos medicamentos e respetivo *layout* das embalagens. Esta fase preparatória foi imprescindível para que o atendimento ao balcão fosse mais fluído já que me permitiu entender mais facilmente o pedido dos clientes, muitas das vezes feito com base em características do aspeto exterior das embalagens, bem como prestar um melhor aconselhamento.

As tarefas de *backoffice* que realizei englobaram: receção de encomendas, arrumação dos produtos rececionados, gestão de *stocks* e prazos de validade, envio de devoluções aos armazenistas, preparação de medicamentos manipulados e observação da conferência de receituário.

### **3.1.3. Autonomia na realização de tarefas**

Desde o início do estágio foi depositada em mim uma grande confiança, o que contribuiu para que a minha evolução e domínio de cada tarefa fossem mais rápidas. Assim, rapidamente me tornei autónoma na realização das tarefas que me eram atribuídas, contribuindo mais ativamente para a dinâmica de funcionamento da farmácia e sentindo-me parte integrante da equipa. Fulcral para isto foi o apoio que sempre me foi prestado e a disponibilidade para me responderem a todas as dúvidas que ia colocando durante o processo.

### **3.1.4. Aconselhamento farmacêutico**

A aprendizagem em contexto de atendimento ao balcão foi o que mais me aliciou neste estágio. O contacto com o público foi um estimulador de aprendizagem ímpar que permitiu uma integração e consolidação global de todos os conhecimentos adquiridos durante a minha formação académica na FFUC, bem como a aquisição de novos conhecimentos que me foram sendo transmitidos pelas excelentes profissionais que se encontram na FSM. Numa fase inicial, comecei por assistir aos atendimentos, prestando muita atenção aos detalhes que eram fornecidos por cada utente e ao aconselhamento personalizado que era feito em cada situação. Este período de tempo proporcionou-me uma agilização de raciocínio na associação de sintomatologias aos possíveis produtos a aconselhar, tornando-me apta a passar para fase de atendimento sozinha.

### **3.1.5. Medição de parâmetros analíticos**

A FSM coloca ao dispor da população a medição de um conjunto de parâmetros analíticos como a pressão arterial, glicémica capilar, colesterol total e peso. Desde cedo me foi possível realizar a medição destes parâmetros, o que constituiu uma boa oportunidade de

introdução ao contacto com o público, quebrando o gelo inicial e permitindo-me começar a conquistar a confiança dos clientes habituais da farmácia.

### **3.1.6. Preparação de manipulados**

Durante o meu estágio vários foram os medicamentos manipulados preparados na FSM, definidos pelo INFARMED como qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico (2). De início, comecei por observar a preparação de alguns manipulados, preenchimento da respetiva folha de produção, cálculo do preço e emissão de rótulo, tendo, de seguida, tido a oportunidade de preparar eu mesma algumas formulações, nomeadamente uma pomada contendo Diprosalic® e Eucerin Aquaphor® para uma jovem com eczema e um xarope de propranolol 10 mg para uma criança. Esta experiência permitiu-me enquadrar em contexto prático a formação adquirida nas aulas de farmácia galénica.

O cálculo do preço de venda ao público (PVP) obedece às especificações constantes na Portaria nº 769/2004, de 1 de julho, que postula que o preço é calculado com base no valor dos honorários de preparação, no valor dos materiais de embalagem e das matérias-primas. O cálculo insere-se num campo de preenchimento presente na ficha do manipulado, à qual seguem anexados o rótulo e a cópia da respetiva receita médica (3).

## **3.2. Fraquezas**

### **3.2.1. Integração recente de um grupo de compras**

No final do ano de 2019, a FSM passou a integrar um grupo de compras. Considero esta mudança como uma fraqueza numa fase inicial visto que esta transição trouxe alguns problemas, nomeadamente: produtos que vinham faturados a preços superiores ao que deveriam vir, de acordo com o preço de grupo, o que implicava despender tempo a analisar, fatura a fatura, linha a linha, se cada produto tinha sido faturado ao preço correto e reclamar os produtos mal faturados; armazéns para os quais a farmácia ainda não aparecia configurada como sendo parte integrante deste grupo de compras; falhas de comunicação na clarificação de todas as condições decorrentes da pertença a este grupo, entre outros. Todos estas falhas levaram a perdas de tempo em reclamações e conferência de faturas que poderiam ter sido empregues na realização de outras atividades.

Durante o tempo em que estive na farmácia, estes problemas foram sendo resolvidos, fazendo com que esta mudança passasse a representar uma força para a farmácia dados os



descontos monetários que se conseguem ter na aquisição de medicamentos quando se é parte integrante de um grupo de compras.

### **3.2.2. Dificuldade inicial na associação dos nomes comerciais aos princípios ativos**

Ao longo do curso, o ensino é feito essencialmente pela aprendizagem dos princípios ativos. Embora isso seja relevante, visto que permite centralizar a abordagem de ensino ao ator principal da ação farmacológica no organismo e que, desde 2012, a prescrição médica é feita por Denominação Comum Internacional (DCI) (4), numa primeira fase, tal constitui um entrave visto existir da parte do estudante um desconhecimento completo da correspondência entre cada princípio ativo e o respetivo nome comercial. Esta é uma barreira que se foi desvanecendo no decorrer do estágio, à medida que me comecei a familiarizar com as apresentações comerciais dos diferentes medicamentos, decorrente dos processos de receção de encomendas, arrumação dos produtos e atendimento ao público.

### **3.2.3. Desconhecimento das várias referências de produtos**

Existe nas farmácias um grande número de referências no que respeita a MNSRM, indicados para serem aconselhados nas mais diversas situações. Numa fase inicial, há, por parte do estudante, um desconhecimento de muitos destes produtos e isso dificulta um pouco o ato de aconselhamento personalizado. Esta foi uma dificuldade que senti que foi sendo ultrapassada à medida que ia assistindo a sucessivos atendimentos e conhecendo novos produtos e as suas condições de aplicabilidade.

## **3.3. Oportunidades**

### **3.3.1. Sifarma 2000®**

Este sistema informático estava implementado na FSM constituindo uma ferramenta valiosíssima dada a grande variedade de funções que permite executar, concentrando num só local a monitorização, gestão e registo das diferentes atividades realizadas na farmácia, o que proporciona uma otimização no processo de gestão da farmácia e de toda a sua atividade.

### **3.3.2. Formação contínua**

A área da saúde caracteriza-se por uma contínua evolução, decorrente dos avanços científicos, com conseqüente geração de novos conhecimentos. O setor farmacêutico, enquanto parte integrante da área da saúde, não escapa a esta atualização de conhecimentos que despoleta a necessidade de uma formação contínua dos profissionais que exercem esta

atividade laboral. Neste sentido, as formações que vão sendo disponibilizadas para os colaboradores da farmácia são de extrema importância já que permitem que estes vão atualizando o seu leque de conhecimentos e, assim, esteja garantida a qualidade dos serviços prestados à população.

Durante o tempo em que estive na farmácia tive a oportunidade de assistir a formações de diversas empresas farmacêuticas como: Bayer, Mylan, Azevedos, FrezyDerm, Velvet Med, entre outras.

### **3.4. Ameaças**

#### **3.4.1. Medicamentos esgotados**

Durante o período de tempo em que estive na farmácia, várias foram as vezes em que os utentes solicitavam medicamentos que estavam esgotados em todos os armazenistas. Este é um fator que está para lá do controlo imediato visto que as encomendas eram feitas, mas os produtos não eram enviados por inexistência no *stock* nos armazenistas. Esta situação representa um problema gravíssimo para aqueles medicamentos que fazem parte da medicação diária de utentes com patologias crónicas, não só ao nível de utentes fidelizados que se recusam a mudar de laboratório, mas sobretudo naqueles medicamentos para os quais não existe uma alternativa, sendo, por isso, muitas das vezes, fonte de descontentamento para os utentes.

#### **3.4.2. Farmácias envolventes e espaços de venda de MNSRM**

A FSM tem, tal como mencionado em 2.1., uma localização central, contudo, na sua envolvente, existem outras farmácias com as quais compete nos preços de venda no que respeita à aquisição pelo público de MNSRM. Para além do mais, a poucos quilómetros de distância, encontra-se o centro comercial Fórum Coimbra que não só tem uma farmácia como também um espaço de venda de MNSRM. Os espaços de venda de MNSRM resultaram da liberalização da comercialização destes medicamentos fora das farmácias em 2005 (5) e vieram contribuir para a destabilização económica das farmácias, constituindo mais um elemento neste circuito concorrencial.

A conjuntura socioeconómica da população portuguesa e, em especial, da fração pensionista faz com que as pessoas tenham uma grande preocupação em economizar, o que as leva a comparar preços entre farmácias e locais de venda de MNSRM para adquirir onde o produto for mais barato. Tudo isto faz com que a definição do preço dos MNSRM não seja um processo linear, sendo necessário ter em consideração a situação económica da farmácia,

o preço do produto nas farmácias e locais de venda de MNSRM envolventes e o tipo de população que serve, para que o preço definido seja o mais competitivo possível, já que mesmo utentes fidelizados tendem a mudar o local de aquisição destes produtos em função do preço.

### **3.4.3. Pandemia da COVID-19**

A pandemia da COVID-19 veio gerar uma revolução nas vendas da farmácia, observando-se um aumento das vendas de suplementos alimentares à base de vitamina C e outros complexos multivitamínicos, bem como um aumento exponencial das vendas de máscaras cirúrgicas, máscaras FFP2 e FFP3, álcool a 70° e a 96°, géis e soluções alcoólicas desinfetantes, bem como luvas e termómetros. Paralelamente, verificou-se ainda um aumento das vendas de MSRM e MNSRM, visto muitas pessoas terem entrado numa espiral de pânico que as levou à farmácia a quererem levantar todas as unidades restantes nas receitas das suas medicações crónicas, bem como criar mini armazéns em casa de ibuprofeno e paracetamol.

Apesar do aumento das vendas, a pandemia trouxe também problemas para as farmácias portuguesas. Começaram a ocorrer falhas no abastecimento de álcool e soluções desinfetantes, bem como de máscaras de proteção individual que estavam racionadas quer para venda quer para proteção individual dos profissionais de farmácia. Para além desta situação, verificou-se também o gerar de um caos na entrega das encomendas pelos armazenistas que reduziram o número de rotas, em alguns casos passando de três rotas diárias para um única entrega diária, sem aviso prévio à farmácia por via informática, no ato da realização de encomenda instantânea, ou por outro meio de comunicação. Desta situação resultou a receção de encomendas com um número de banheiras por entrega muito superior àquilo que é comportável para dar a sua receção em tempo útil. A adicionar a isto, como consequência do pânico que se instalou na população ainda antes do decretar de estado de emergência no país, a farmácia enfrentou vários dias em que estava cheíssima e tinha filas de grandes dimensões já fora do edifício, revelando-se os colaboradores existentes insuficientes em número para dar vazão a tão grande afluência de clientes, o que teve como consequência a acumulação de trabalho de *backoffice* que, embora imprescindível, não havia tempo para ser realizado.

No decorrer deste processo, foram instalados acrílicos nos balcões e implementadas medidas de trabalho e operacionalização diferentes dentro da farmácia, como mecanismo de proteção dos seus colaboradores: só poderiam ser atendidas duas pessoas ao mesmo tempo, em pontos extremos do balcão, as pessoas deveriam aguardar a sua vez fora do edifício da farmácia e os colaboradores deveriam estar adequadamente protegidos por luvas e máscara. Estas medidas iniciaram-se antes do decretar de estado de emergência e estiveram em vigor

durante todo o período de vigência do mesmo, bem como nos meses subsequentes. Durante os meses de março, abril e maio, a farmácia sofreu ainda uma expansão no seu horário de funcionamento, passando a laborar das 8h30 às 20h30 com o corpo técnico dividido em duas equipas que trabalhavam em dias alternados.

Na sequência da declaração por parte da Organização Mundial de Saúde, no dia 11 de março de 2020, do surto da COVID-19 como pandemia, no dia 17 de março de 2020, por ponderação pessoal e mediante autorização da FFUC, suspendi o meu estágio na FSM tendo, no dia 20 de março de 2020, o Professor Doutor Francisco Veiga, diretor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, declarado o cancelamento de todos os estágios, suspendendo todas as atividades letivas ou não letivas presenciais. Deste modo, e uma vez que me foi concedida a oportunidade de realizar um segundo estágio na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., o meu estágio na FSM ficou suspenso, tendo procedido à conclusão do número de horas de estágio durante o mês de agosto.

#### **4. Considerações Finais**

A realização do estágio em farmácia comunitária como clímax da formação académica foi de extrema importância já que me permitiu aplicar, em contexto real, todos os conhecimentos que me foram sendo ministrados ao longo do curso, contribuindo para a sua consolidação e integração e garantido o meu desenvolvimento enquanto especialista do medicamento e agente de saúde pública.

A farmácia comunitária constitui, sem sombra de dúvidas, um elemento chave na cadeia de prestação de cuidados de saúde, garantindo o acesso de toda a população aos medicamentos e a um serviço de aconselhamento de alta qualidade, fruto da formação académica dos seus profissionais, diferenciando-a notoriamente dos locais de venda de MNSRM.

Com este estágio tive o privilégio de evoluir enquanto pessoa e profissional, de diariamente beber do conhecimento e experiência das farmacêuticas cujo trabalho tive oportunidade de acompanhar e de integrar uma equipa de excelência na qual me senti incluída desde o primeiro dia.

Apesar da fragmentação do estágio devido à pandemia da COVID-19, vejo o meu estágio curricular em farmácia comunitária como uma experiência bastante positiva e enriquecedora que me dotou das bases necessárias para o exercício pleno da atividade profissional enquanto farmacêutica.

## Referências Bibliográficas

- (1) DYSON, ROBERT - **Strategic development and SWOT analysis at the University of Warwick**. European Journal of Operational Research. 6.Vol. 152:3 (2004) 631-640.
- (2) INFARMED - **Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados**. Portaria n° 594/2004, de 2 de Junho.
- (3) INFARMED - **Regime jurídico a que devem obedecer a preparação e dispensa de medicamentos manipulados**. Portaria n° 769/2004.
- (4) ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SISTEMA DE SAÚDE - **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde**. 3 (2014) 1-23.
- (5) MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto de Lei n° 134/2005 de 16 de Agosto**. Diário da República, Série I-A. N° 156/2005 (2005), p. 4763-4765.
- (6) **Gino-canesten® creme vaginal** – (2020). [Consult. 3 abr. 2020]. Disponível em: [https://www.antifungicos.bayer.pt/static/documents/Gino-Canesten%20creme\\_Fl.pdf](https://www.antifungicos.bayer.pt/static/documents/Gino-Canesten%20creme_Fl.pdf)
- (7) **AVEENO® Daily Moisturising Cuidado Íntimo** – (2020). [Consult. 3 abr. 2020]. Disponível em: <https://www.aveenoprofissional.pt/products/banho-duche/aveenor-daily-moisturising-cuidado-intimo>
- (8) **GINSACTIV SPORT®** - Suplemento Ideal a prática desportiva! (2020). [Consult. 3 abr. 2020]. Disponível em: <https://ginsactivsport.pt/sport/>

## **ANEXO**

### **Caso Prático 1**

Uma jovem de 18 anos dirige-se à farmácia com queixas de prurido vaginal intenso. Refere que tem um corrimento branco e espesso, mas sem cheiro forte associado, e que sente desconforto na zona vaginal, solicitando algo que lhe resolva a situação.

Aconselhamento: Dada a sintomatologia descrita concluí que esta jovem estaria, muito provavelmente, com uma candidíase vaginal, uma infeção fúngica vaginal provocada pelo fungo oportunista *Candida albicans*. Assim, o produto que aconselhei para o tratamento deste desequilíbrio foi Gino-canesten® creme vaginal, um MNSRM que contém 10 mg/g de clotrimazol, um antifúngico de largo espetro. Referi à jovem que deveria introduzir o aplicador cheio de creme vaginal o mais profundamente possível na vagina, à noite, ao deitar, uma vez por dia, durante 6 dias consecutivos e que, caso sentisse irritação também nos lábios vaginais, poderia aplicar externamente o creme para aliviar o prurido. De referir que a jovem foi ainda referenciada para acompanhamento médico, caso os sintomas persistissem além dos 7 dias, bem como alertada para o facto de o tratamento estar recomendado para ser realizado fora do período menstrual (6). Alertei ainda a jovem para a importância de usar roupa interior de algodão e para evitar usar sabonetes ou géis de banho perfumados agressivos aos órgãos genitais já que estes podem causar irritação e levar a um desequilíbrio do pH vaginal que, numa condição normal, é ligeiramente mais ácido que o da restante pele do corpo, contribuindo para aumentar a probabilidade de infeções vaginais. Assim, recomendei-lhe ainda AVEENO® Daily Moisturising Cuidado Íntimo para utilização na higiene íntima diária, uma formulação que limpa delicadamente, enquanto mantém o pH fisiológico, tendo a capacidade de restaurar a barreira de proteção natural, acalmando a sensação de irritação ao mesmo tempo que previne uma nova infeção (7).

### **Caso Prático 2**

Um senhor de 40 anos dirige-se à farmácia solicitando um suplemento alimentar para melhorar a performance desportiva. Refere que adora praticar desporto, mas que o dia a dia no trabalho tem sido exigente e já não sente tanta energia para depois ir treinar.

Aconselhamento: Tendo em consideração a descrição do senhor, aconselhei-lhe Ginsactiv sport<sup>®</sup>, um suplemento alimentar sem açúcar, em formato de ampola bebível de 10 mL. Este suplemento é constituído por *Panax ginseng*, magnésio, *Ginkgo biloba*, aspartato de arginina e algumas vitaminas, proporcionando energia, combatendo a fadiga física e aumentando a função muscular. O *Panax ginseng* contém glicósidos triterpénicos, vulgarmente designados ginsenósidos, como principal componente bioativo que foram associados a um aumento da *performance* desportiva. O magnésio vai contribuir para o normal funcionamento dos músculos, do sistema nervoso e para a produção e libertação de energia. A *Ginkgo biloba* contém flavonóides como principal composto bioativo, conhecidos pelo seu poderoso efeito antioxidante. O aspartato de arginina intervém em situações em que seja necessário um aporte suplementar de aminoácidos de rápida assimilação, contribuindo para uma melhoria da *performance* física e intelectual. Para além destes compostos, este suplemento contém ainda vitaminas que contribuem para um normal metabolismo produtor de energia (vitaminas C, B1, B2, B3, B5, B6) e para a redução do cansaço e da fadiga (vitamina C, B5, B6, B9, B12) (8).

## **Parte II**

# **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica (Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.)**

**Estágio sob a orientação da Doutora Ana Catarina Pinto e supervisão do  
Doutor António Lucas Nunes**



## **Lista de Abreviaturas**

BLPH – Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

I&I – Investigação e Inovação

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

## I. Introdução

No âmbito da unidade Estágio Curricular, inserida no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), realizei, de 18 de maio a 31 de julho, estágio na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A. (BLPH), sob orientação da Doutora Ana Catarina Pinto e supervisão do Doutor António Lucas Nunes.

O conteúdo programático do MICF é muito abrangente o que permite a formação de profissionais aptos a exercer atividade profissional em diferentes áreas do saber diretamente relacionadas ou não com o medicamento, das quais a indústria farmacêutica constitui um exemplo. O papel do farmacêutico numa indústria farmacêutica é também ele vasto, tendo este a capacidade do ponto de vista da sua formação para atuar em diferentes áreas como investigação e inovação, desenvolvimento analítico e galénico, fabricação, embalamento, armazém, planeamento e gestão produção, controlo de qualidade, qualidade do produto e *compliance*, gestão da qualidade, assuntos regulamentares e gestão de projetos.

Tendo em consideração o grau de formação académica supramencionado, optei por realizar um segundo estágio curricular, no seguimento do estágio realizado em farmácia comunitária, por forma a tornar mais robusta a minha formação académica e a ter um primeiro contacto, ainda em período estudantil, com esta vertente profissional do farmacêutico. Na sequência de um processo de candidatura, entrevista e seleção pelos recursos humanos da BLPH, foi-me dada a possibilidade de integrar o setor de “Investigação e Inovação” que se insere no departamento de parcerias estratégicas e desenvolvimento de produto da BLPH.

Este estágio permitiu-me contactar de perto com a atividade de investigação no seio de uma indústria farmacêutica, reforçando em mim a perceção do rigor, qualidade e profissionalismo que são exigidos neste ramo de atividade.

O presente relatório de estágio consiste numa análise segundo o modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) do estágio curricular realizado, uma importante ferramenta de planeamento estratégico.

## **2. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.**

### **2.1. Localização e breve contextualização evolutiva**

A Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A. iniciou a sua atividade em fevereiro de 2001 depois da compra da unidade industrial sediada em São Martinho do Bispo (Coimbra) ao grupo alemão Bayer. O seu grupo económico engloba 18 empresas e uma grande parte da sua produção (mais de 80%) é exportada para mais de 40 países. A atividade da Bluepharma® abrange toda a cadeia de valor do medicamento, desde a investigação e desenvolvimento até à entrada no mercado, produzindo maioritariamente formas farmacêuticas sólidas orais (1).

No que respeita à investigação, as suas principais competências passam pela realização de um *screening* à atividade terapêutica de moléculas inovadoras, desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos e conceção de novas plataformas de nanotecnologia para entrega direcionada de fármacos (2).

### **2.2. Equipa – Estrutura funcional**

A Investigação e Inovação (I&I) está organizada em duas unidades funcionais, uma denominada por “assuntos científicos” – onde realizei o meu estágio – cuja principal função é dar suporte científico às diferentes atividades laboratoriais que são maioritariamente executadas por colaboradores alocados à unidade funcional “Inovação tecnológica”.

Em período pré-pandemia, a equipa de Investigação e Inovação (I&I) realizava as suas atividades laborais na empresa das 8h30 às 17h30. Com a pandemia da COVID-19, e seguindo o Plano de Contingência da empresa, o grupo de I&I, afeto às atividades laboratoriais, começou a laborar em turnos em espelho, estando os colaboradores na empresa das 9h às 16h ou das 17h às 24h, com realização de 1h30 de teletrabalho depois ou antes do seu turno, respetivamente.

## **3. Análise SWOT**

Uma análise SWOT tem como objetivo a identificação de forças (*Strengths*) e fraquezas (*Weakness*) do objeto de análise, bem como das oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) do meio que lhe é envolvente. Os pontos fortes (Forças) e os pontos fracos (Fraquezas) são identificados por avaliação interna, relativamente às estratégias a longo prazo, enquanto que as oportunidades e as ameaças são identificadas a partir de uma avaliação externa, expondo fatores que estão para lá do controlo imediato, mas que não podem ser ignorados. Desta análise resultam as eventuais vantagens competitivas a proteger e as

eventuais desvantagens a eliminar (3). A Tabela 3 compila as principais forças, fraquezas, oportunidades e ameaças identificadas na sequência do estágio realizado.

**Tabela 3.** Análise SWOT – Identificação de Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças.

<b>Forças</b>	<b>Fraquezas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metodologia <i>Kaizen</i><sup>TM</sup></li> <li>• Reunião de planeamento semanal</li> <li>• Equipa técnica</li> <li>• Atribuição de um projeto sob forma de desafio</li> <li>• Atribuição de uma orientadora</li> <li>• Reunião de acompanhamento semanal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração do estágio</li> </ul>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sessões de formação</li> <li>• Reuniões presenciais com a orientadora</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teletrabalho devido à COVID-19</li> <li>• Formações em áudio</li> </ul>

### 3.1. Forças

#### 3.1.1. Metodologia *Kaizen*<sup>TM</sup>

No seu funcionamento enquanto empresa, a Bluepharma<sup>®</sup> adota em todos os processos uma metodologia *Kaizen*<sup>TM</sup>. Este termo é formado a partir de “Kai” que significa modificar e “Zen” que significa para melhor, traduzindo, assim, uma abordagem de processos que visa a melhoria contínua. Existem 5 princípios fundamentais que são intrínsecos a qualquer ferramenta de *Kaizen*<sup>TM</sup>: conhecer o cliente, deixar fluir (todos na organização devem ter como objetivo criar valor e minimizar o desperdício), ir para o *gemba* (partir para a ação no terreno), promover a afirmação de cada elemento da equipa e ser transparente (o desempenho e as melhorias devem ser alcançáveis e passíveis de medição) (4).

Relativamente ao Setor de I&I, a metodologia *Kaizen*<sup>TM</sup> pode ser verificada, em primeira instância, nas reuniões diárias. Estas reuniões iniciam o dia de trabalho e têm uma duração programada de quinze minutos. O objetivo é pôr todos os elementos da equipa a par dos resultados que estão a ser obtidos em determinado plano de trabalho, a fim de expor os problemas identificados e de que todos possam dar o seu parecer para a resolução dos mesmos. Com isto, fazem-se pequenos ajustes diários que proporcionam uma melhoria significativa no resultado final do processo. A mesma reunião era também aproveitada para pequenas comunicações gerais de interesse para os presentes.

Cada dia da semana era dedicado a um projeto em particular, tendo estas reuniões sido fundamentais para a minha integração no grupo de trabalho, permitindo-me inteirar dos projetos que o grupo tinha em mãos, bem como das idiossincrasias de cada um deles.

### **3.1.2. Reunião de planeamento semanal**

O grupo realiza uma reunião semanal, no final da semana, com uma duração de 2h a 2h30, em que cada um dos elementos expõe de forma mais detalhada os resultados que tem obtido no seu trabalho, identificando quais as atividades que foram realizadas durante a semana, bem como o seu plano de trabalho previsto para a semana seguinte.

A integração destas reuniões foi fundamental visto que me permitiu contactar com a metodologia de trabalho de cada elemento e inteirar-me com mais detalhe dos diferentes projetos que o grupo tinha em mãos. Com o tempo, fruto da experiência que trazia da farmácia comunitária e da confiança que fui adquirindo, comecei também a dar, pontualmente, o meu parecer para a discussão de algumas questões e resolução de alguns dos problemas identificados.

### **3.1.3. Equipa técnica**

A equipa técnica do grupo de Investigação e Inovação é multidisciplinar, altamente qualificada e maioritariamente constituída por pessoas jovens, possuindo alguns elementos com vários anos de experiência profissional.

Cada elemento tem responsabilidades definidas o que permite melhor gerir e otimizar os objetivos institucionais a serem alcançados, de modo a garantir o seu cumprimento.

Neste grupo de trabalho é notório o espírito de equipa e de entreaajuda, tendo estes sido fundamentais para que rapidamente me sentisse acolhida e integrada. Senti por parte de todos uma genuína vontade de ajudar e uma atitude afável, tendo isso sido fundamental para que me sentisse confortável na colocação de dúvidas e na participação nas reuniões de planeamento.

### **3.1.4. Atribuição de um projeto sob forma de desafio**

Devido às restrições introduzidas pela pandemia da COVID-19, o meu estágio curricular na Bluepharma® decorreu essencialmente em regime de teletrabalho, com visitas pontuais à empresa para me reunir com a minha orientadora. Tendo em consideração o modelo do estágio e os objetivos do grupo de trabalho, foi-me designada a tarefa de desenvolver uma revisão bibliográfica relativa a um tema de interesse para os projetos em

curso no Setor. Esta atribuição de tarefas e a relevância do tema para o grupo foram uma alavanca importante para que o trabalho em casa fosse mais fácil e para que houvesse um sentido de propósito.

### **3.1.5. Atribuição de uma orientadora**

À chegada ao grupo de trabalho, como parte integrante da política da BLPH, foi-me atribuída uma orientadora responsável por acompanhar mais de perto o meu trabalho, transmitindo-me todos os valores e atitudes que regem a atividade da empresa. A Doutora Ana Catarina Pinto foi a pessoa selecionada pela gestão de topo para ser a orientadora do meu estágio curricular.

Na minha opinião, a atribuição de uma orientadora foi fundamental para que mais depressa me sentisse integrada neste meio corporativo que era novo para mim e também para que me sentisse apoiada e acompanhada no desenvolvimento do projeto atribuído. A Doutora Ana Catarina Pinto foi exímia na execução das suas funções, sempre disponível para me esclarecer qualquer dúvida, não obstante a sua elevada carga de trabalho, uma pessoa muito afável e atenciosa que considero ter tornado mais fácil a minha adaptação à empresa e às condições de teletrabalho.

Não obstante, devo ressaltar também o acompanhamento do Doutor António Lucas Nunes, Responsável do Setor de I&I, sempre disposto a ajudar e presente em todas as reuniões de acompanhamento semanais do estágio.

### **3.1.6. Reunião de acompanhamento semanal**

Semanalmente, tinha uma reunião com a minha orientadora e com o Responsável do Setor de I&I para apresentar o trabalho desenvolvido durante a semana e para esclarecimento de dúvidas. Nestas reuniões eram identificados os pontos de melhoria do trabalho e abordado o meu plano de trabalho para a semana seguinte.

Considero que estas reuniões foram de primordial importância pois permitiram a realização de pequenos ajustes ao longo do tempo, garantindo a contínua melhoria do trabalho desenvolvido e uma gestão de tempo mais efetiva.

## **3.2. Fraquezas**

### **3.2.1. Duração do estágio**

O estágio curricular em indústria tem uma duração programada de 3 meses, duração que garante que o aluno consegue conciliar a sua realização com o estágio em farmácia

comunitária, obrigatório para o exercício profissional da atividade de farmacêutico. Contudo, num ramo tão vasto e complexo como é a indústria farmacêutica, esta duração acaba por permitir apenas uma breve introdução a este ramo de atividade, sendo necessário mais tempo para uma profícua cimentação de conhecimentos e até para que outro tipo de atividades possam ser realizadas.

Devido às condicionantes introduzidas pela pandemia da COVID-19, este estágio sofreu uma redução de 2 semanas face ao que estava programado inicialmente, tornando ainda mais curto o tempo disponível para melhorar o projeto atribuído, bem como para usufruir da experiência profissional associada.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Sessões de formação**

Devido às exigências da atividade de uma indústria farmacêutica e às particularidades do contexto em que esta atua, torna-se essencial assegurar a formação inicial e contínua dos seus colaboradores, por forma a garantir que todos têm em posse o conhecimento necessário à execução das suas funções.

Neste contexto, como parte integrante do processo de acolhimento de novos colaboradores na empresa, e na impossibilidade de assistir a formações presenciais devido ao Plano de Contingência implementado na Bluepharma®, recebi formação remota sobre diversos temas, nomeadamente: Investigação, Desenvolvimento e Inovação; Qualidade e Boas Práticas de Fabrico; Ambiente, Segurança e Saúde no trabalho; Melhoria Contínua; Assuntos Regulamentares; Farmacovigilância; entre outras. As formações mencionadas são ministradas a todos os novos colaboradores da empresa, independentemente do departamento que integrem. Depois, em função do departamento e das funções que cada colaborador nele desempenhe, há ainda lugar a que sejam ministradas formações mais específicas.

Considero que estas formações foram extremamente importantes por todo o manancial de conhecimento que transmitiram, permitindo melhor compreender o contexto de trabalho, bem como assegurar uma melhor execução de tarefas.

#### **3.3.2. Reuniões presenciais com a orientadora**

Tal como mencionado anteriormente, semanalmente tinha reuniões com a minha orientadora e com o Responsável do Setor de I&I. Algumas destas reuniões foram presenciais na Bluepharma®, dando-me a oportunidade de me deslocar até à empresa e de sentir um

bocadinho o espírito de trabalho na empresa, muito diferente daquilo que se sente quando se está em teletrabalho.

Considero que estas reuniões presenciais foram fundamentais visto que realizar um estágio em contexto de teletrabalho é muito diferente de o fazer presencialmente. Estas reuniões permitiram-me experienciar trabalhar no ambiente da empresa, sentir a diferença de trabalhar em ambiente corporativo e estreitar relações humanas com os meus colegas de trabalho.

### **3.4. Ameaças**

#### **3.4.1. Teletrabalho devido à COVID-19**

Tal como suprarreferido, o meu estágio curricular decorreu essencialmente em regime de teletrabalho. Embora sendo estas as condições possíveis, considero este modelo como uma ameaça pois trabalhar em regime de teletrabalho não é comparável ao trabalho presencial, sobretudo quando este é um ambiente novo e estamos a conhecer as pessoas pela primeira vez. A energia que se sente no local de trabalho, o ambiente e envolvimento do mesmo e a dinâmica das relações com os colegas são fatores que auxiliam ao processo de integração e que impulsionam a motivação para trabalhar. Trabalhar todos os dias em casa pode ser desafiante e desmotivante.

Na minha opinião, o facto de também a minha orientadora e o responsável de Setor se encontrarem maioritariamente em regime de teletrabalho, a empatia que senti com eles e o apoio constante que me deram foram os fatores que permitiram melhor superar este obstáculo.

#### **3.4.2. Formações remotas**

Devido ao modelo em que o estágio decorreu, fruto das condicionantes introduzidas pela COVID-19, as sessões de formação ministradas foram cedidas em formato de gravações. Visto serem gravações, embora os contactos dos formadores tenham sido disponibilizados, a colocação de dúvidas estava condicionada pela barreira da ausência da comunicação humana direta. Quando este tipo de formações é ministrado presencialmente torna-se mais fácil expor dúvidas, não só porque é mais fácil de as explicar, mas também porque ficamos mais desinibidos em expor o nosso raciocínio fruto das relações humanas que se estabelecem.



#### **4. Considerações Finais**

A realização do estágio curricular em indústria farmacêutica constituiu um marco importante na minha formação acadêmica pois permitiu-me aplicar e interligar alguns conhecimentos adquiridos durante o plano de estudos do MICEF, bem como abriu uma janela de oportunidades à aquisição de novos conhecimentos relacionados com a área da investigação e inovação farmacêutica.

Este estágio permitiu-me compreender melhor os diferentes campos de atuação de um farmacêutico no ramo industrial, mostrando-me a interdependência existente entre os diferentes departamentos e o papel chave que cada um deles desempenha.

Considero que esta experiência profissional foi fundamental na minha formação acadêmica pois permitiu-me aprimorar competências no domínio da pesquisa científica e tratamento de informação, competências fundamentais a um bom investigador, tornando-me mais apta e confiante para a minha entrada no mercado de trabalho.

Tendo em consideração todas as condicionantes introduzidas pela pandemia da COVID-19 que levaram a que muitas instituições de acolhimento cancelassem os estágios curriculares programados para se iniciarem no mês de maio, sinto-me muita grata pela oportunidade que a Bluepharma® me concedeu e pela equipa de excelentes profissionais que me recebeu, acolheu e acompanhou a minha passagem pela empresa. O rigor, o empenho, a dedicação e o brio profissional que pautam a atividade dos profissionais da Bluepharma® são alguns dos pontos positivos que ressalvo deste estágio.

## Referências Bibliográficas

- (1) BLUEPHARMA - **Grupo Bluepharma**. (2020). [Consult. 1 ago. 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
- (2) BLUEPHARMA - **Innovative Research**. (2020). [Consult. 1 ago. 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/innovation/research.php>
- (3) DYSON, ROBERT - **Strategic development and SWOT analysis at the University of Warwick**. European Journal of Operational Research. 6.Vol. 152:3 (2004) 631-640.
- (4) KAIZEN INSTITUTE - **What is Kaizen?** (2020). [Consult. 1 ago. 2020]. Disponível em: <https://www.kaizen.com/what-is-kaizen.html>

## **Parte III**

### **Monografia**

# **“Novos horizontes terapêuticos para o cancro da mama: papel da medicina de precisão”**

**Orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes**

## **Lista de Abreviaturas**

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica

BCI – breast cancer index

CDK – cinases 4/6 dependentes de ciclina

CE – conformidade europeia

CK – citoqueratinas

CM – cancro da mama

CNVs – variações no número de cópias

CS – corrente sanguínea

CTCs – células tumorais circulantes

CTDs – células tumorais disseminadas

DCIS – carcinoma ductal *in situ*

DCV – doenças cardiovasculares

DNAIc – DNA livre circulante

DNAtc – DNA tumoral circulante

EB – excisão de bases

EDO – espectroscopia de difusão ótica

H/I – rácio HOXB13/IL17BR

HER2 - recetor 2 do fator de crescimento epidermal humano

IM – imunomodulador

IR – índice de radiosensibilidade

LAR – recetor androgénio luminal

M – mesenquimal

MEC – matriz extracelular

MGI – molecular grade index

MO – medula óssea

MP – medicina de precisão

MSL – mesenquimal tipo estaminal

NGS – sequenciação de nova geração

NL – nódulos linfáticos

PAM50 – Prediction Analysis for Microarrays

PARP – Poli (ADP-ribose) polimerase

pERK – ERK fosforilado

PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3 – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PM – pós-menopausa

qRT-PCR – reação de polimerização em cadeia com transcriptase reversa

RCS – rutura de cadeia simples

RE – recetor estrogénio

RFCE – recetor do fator de crescimento epidérmico

RH – recombinação homóloga

RM – ressonância magnética

RP – recetor da progesterona

RTK – recetores das tirosina cinases

SEER – Surveillance, Epidemiology, and End Results

SNPs – Polimorfismos de nucleótido único

TEP – tomografia por emissão de positrões

TN – triplo negativo

TRH – terapêutica de reposição hormonal

TSB – tumores do subtipo basal

WES – sequenciação da totalidade do exoma

WGS – sequenciação da totalidade do genoma

WTS – análise de todo o transcriptoma

## Resumo

O cancro da mama é uma neoplasia maligna da mama, de origem multifatorial, que afeta sobretudo mulheres e cuja incidência, em virtude do aumento da esperança média de vida, tem tendência a aumentar.

Tendo em consideração que dois doentes cujo tumor seja classificado como pertencendo a um mesmo subtipo podem não responder da mesma forma à terapêutica padrão, em virtude da heterogeneidade intratumoral e interindividual, torna-se necessário individualizar o regime de tratamento de cada indivíduo às idiossincrasias da sua manifestação da doença. Foi para satisfazer esta premissa que foi desenvolvida a abordagem da medicina de precisão, uma ferramenta que tem em consideração as características genéticas e fenotípicas do tumor, a fim de individualizar o regime de tratamento e garantir a administração do medicamento correto, na dose correta e ao doente correto. De entre os instrumentos que servem de suporte à medicina de precisão é possível mencionar o uso de biomarcadores moleculares para terapêutica direcionada, as ferramentas de sequenciação de nova geração, bem como o uso de testes que identificam assinaturas de expressão génica.

Embora a medicina de precisão tenha um grande potencial para aplicação na clínica, em virtude da complexidade que lhe é inerente, existem entraves à sua implementação que necessitarão de uma forte colaboração interdisciplinar para serem ultrapassados, de modo a que se possa começar a usufruir de todo o potencial desta ferramenta.

Estão já em curso alguns ensaios clínicos que visam demonstrar o potencial clínico da medicina de precisão, pelo que é expectável que, nos próximos anos, a medicina de precisão seja robustamente validada e, desse modo, adquira maior aplicabilidade na prática.

**Palavras-chave:** cancro da mama, medicina de precisão, “*one size fits all*”, individualização do tratamento.

## **Abstract**

Breast cancer is a malignant neoplasm of the breast with a multifactorial origin, which mainly affects women. Its incidence, due to the increase in average life expectancy, tends to increase.

Knowing that two patients whose tumor is classified as belonging to the same subtype may not respond in the same way to standard therapy, due to intratumor and interindividual heterogeneity, it is necessary to individualize the treatment regimen of each individual to the idiosyncrasies of his disease manifestation. In order to address this premise, precision medicine approach was developed. This tool takes into account the genetic and phenotypic characteristics of the tumor, in order to individualize the treatment regimen and ensure the administration of the right medicine, in the right dose, to the right patient. Among the instruments that support precision medicine approach, it's possible to mention the use of molecular biomarkers for targeted therapy, next generation sequencing tools, as well as the use of tests that identify gene expression signatures.

Although precision medicine has great potential for clinical application, due to its inherent complexity, there are obstacles to its implementation that will require a strong interdisciplinary collaboration to be overcome, so that one can begin to enjoy the full potential of this tool.

Some clinical trials are already underway that aim to demonstrate the clinical potential of precision medicine. Therefore, it is expected that, in the coming years, precision medicine will be robustly validated and, thus, will acquire greater applicability in practice.

**Keywords:** breast cancer, precision medicine, one size fits all, treatment individualization.

## **1. Introdução**

O cancro é considerado como um problema de saúde pública a nível mundial, constituindo uma das principais causas de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares. Nas mulheres, o cancro da mama, um tumor maligno cujo desenvolvimento envolve a acumulação de múltiplas alterações genéticas e/ou modificações epigenéticas com consequente desregulação das funções celulares normais, é o tumor com maior incidência e prevalência, bem como mortalidade (1;2).

Os avanços científicos das últimas décadas permitiram reduzir a taxa de mortalidade por cancro da mama, contudo, devido ao facto de o cancro da mama não ser uma doença mas um conjunto de doenças que se revestem de elevada heterogeneidade intertumoral e intratumoral, torna-se necessário que as estratégias terapêuticas adotadas sejam cada vez mais individualizadas às idiosincrasias da doença de cada indivíduo, por forma a que se consigam maiores taxas de cura. Foi neste sentido que surgiu a medicina de precisão, uma abordagem terapêutica que, através do conhecimento da composição molecular, das características genéticas e fenotípicas do tumor, pretende individualizar o regime de tratamento e prevenção da doença de cada indivíduo, por forma a garantir o máximo de benefício com o mínimo de efeitos deletérios e uma racionalização dos recursos de saúde (3-5).

O potencial da medicina de precisão estende-se muito além da oncologia, abrangendo todo o sistema de cuidados de saúde. Contudo, ao longo desta monografia irão ser expostos os principais pressupostos da sua aplicação no contexto da prevenção e tratamento do cancro da mama.

## **2. Cancro da mama**

O cancro da mama (CM) é uma doença complexa, onde se constata existir um dinamismo biológico entre as várias etapas de transformação maligna de células normais. Este processo transformativo é complexo e envolve a acumulação de múltiplas alterações genéticas e/ou modificações epigenéticas. Entre as alterações genéticas, é possível mencionar: ganhos de função em que ocorre uma ativação de proto-oncogenes através de mutações no DNA, rearranjos ou amplificações; e perdas de função caracterizadas por inativação de genes de supressão tumoral mediante mutações ou deleções (6). No que respeita às alterações epigenéticas, estas incluem metilação do DNA, modificações pós-transcricionais das histonas e posicionamento do nucleossoma, capazes de regular a expressão de genes, bem como os níveis de microRNAs (7). A metilação do DNA constitui, provavelmente, a modificação



epigenética mais estudada já que, em muitas situações malignas, ocorre uma alteração na regulação e nos padrões de metilação do DNA. A hipermetilação de ilhas CpG associadas à região promotora de genes específicos reveste-se de elevada importância, sobretudo se relacionada com genes supressores tumorais já que provocará o seu silenciamento (8). Por outro lado, a hipometilação da região promotora de proto-oncogenes resultará na sua ativação (9). Assim, é possível concluir que a regulação epigenética da expressão génica representa um mecanismo alternativo ou complementar aos eventos mutacionais na oncogénese (8).

## 2.1. Epidemiologia

O cancro é um grande problema de saúde pública a nível mundial e representa uma das principais causas de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares (DCV). Nos homens, o cancro da próstata e do pulmão são os que têm maior incidência, enquanto que nas mulheres é o CM (1;2;10).

O CM masculino é raro e pouco estudado, em comparação com o CM feminino, representando menos de 0,5% dos diagnósticos de cancro em homens. Dados do programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) (National Cancer Institute, USA)* demonstraram que as melhorias obtidas na sobrevivência de CM nos homens ficaram atrás do conseguido nas mulheres, o que leva a que os pacientes do sexo masculino com CM tenham menores probabilidades de sobrevivência, em comparação com o sexo feminino (11).

O CM feminino é responsável por cerca de 25% dos cancros femininos, constituindo a principal causa de morte por cancro entre as mulheres em todo o mundo (1;12;13).

As estimativas mundiais feitas para o ano de 2018 apontavam para 2 088 849 novos casos de CM e 626 679 mortes, em mulheres de todas as idades, com uma prevalência de 46,3 em cada 100.000. Em Portugal, as estimativas apontavam para 6 974 novos casos e 1 748 mortes (1;13).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa no Cancro da Organização Mundial de Saúde, prevê-se que o número total de casos de CM feminino aumente no futuro, estimando-se um valor próximo de 3 milhões em 2040 (14).

Apesar da elevada prevalência, observa-se uma redução na taxa de mortalidade por CM, o que foi atribuído às melhorias no tratamento e ao aumento da capacidade de deteção precoce. No entanto, nem todos os segmentos da população beneficiaram de igual forma desses avanços, existindo uma grande divergência nas tendências de mortalidade a longo prazo por CM entre mulheres de países desenvolvidos e países em desenvolvimento (4;15).

Constatou-se que as taxas de incidência de CM são mais altas na América do Norte, Austrália/Nova Zelândia e no oeste e norte da Europa, e mais baixas na Ásia e na África

subsaariana, tendo-se verificado uma maior incidência e mortalidade por CM em mulheres afro-americanas e caucasianas comparativamente a mulheres de outras etnias (15).

## **2.2. Fisiopatologia**

O tecido mamário é constituído por um conjunto organizado de células lobulares, ductais e estromais que, em condições normais, sob influência hormonal, se multiplicam e dividem conforme as necessidades do organismo, num processo denominado renovação celular. Todo este processo está altamente regulado, por forma a manter a homeostasia, contudo, mediante a acumulação de múltiplas alterações genéticas e/ou modificações epigenéticas, as células perdem os seus mecanismos de regulação e inicia-se um processo de tumorigénese em que ocorre uma alteração na capacidade de regular o ciclo celular, a transcrição genética e a apoptose, resultando, tipicamente, na formação de uma massa ou de um nódulo. As células cancerígenas geradas têm, na maioria dos casos de CM, origem nas células lobulares (glândulas de leite) ou nos ductos que conectam os lóbulos ao mamilo (6;16).

O CM é uma doença heterogénea que se caracteriza por variabilidade nas suas características morfológicas, evolutivas e de resposta à terapêutica, não apenas entre tumores que surgem no mesmo órgão (heterogeneidade intertumoral), mas também dentro dos tumores individuais (heterogeneidade intratumoral) (3).

A heterogeneidade intertumoral leva à classificação dos tumores em subtipos, caracterizados por marcadores moleculares específicos, comportamentos biológicos únicos e, conseqüentemente, diferentes padrões de resposta clínica aos tratamentos (3).

No contexto da heterogeneidade intratumoral, verifica-se que o tumor é constituído por subpopulações celulares que são fenotipicamente diferentes. Mutações genéticas e/ou modificações epigenéticas são uma fonte de heterogeneidade intratumoral capaz de explicar o motivo pelo qual os mesmos tipos de células têm variantes fenotípicas. Este tipo de heterogeneidade pode ser entendido como a capacidade do tumor de se adaptar às condições do microambiente que o envolve (17;18).

O microambiente do tumor pode ser classificado com uma entidade dinâmica constituída por células cancerígenas e não cancerígenas. As células não cancerígenas incluem fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células do sistema imune. Deste microambiente estromal fazem ainda parte fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (19). É importante referir que o próprio microambiente do tumor não é completamente homogéneo, já que diferentes regiões do tumor poderão apresentar diferentes densidades de vasos sanguíneos e linfáticos, diferentes tipos e quantidades de células infiltradas, bem como uma composição diferenciada da matriz extracelular, o que conduzirá a uma variedade de

manifestações fenotípicas. A interação coordenada entre as próprias células tumorais e destas com o microambiente que as envolve é fonte de heterogeneidade capaz de condicionar bastante a progressão da doença, representando um desafio ao diagnóstico, prognóstico e gestão da terapêutica já que uma amostra de tumor colhida durante a biópsia não será necessariamente representativa da composição real do tumor (17;19;20).

Foram apontadas duas teorias para explicar esta heterogeneidade intratumoral: teoria das células estaminais cancerígenas que propõe a existência de um subconjunto de células com propriedades de células estaminais que conduzem à iniciação e progressão do tumor, gerando todos os tipos de células no tumor e contribuindo para a heterogeneidade intratumoral (21;22); teoria da evolução clonal que preconiza que o microambiente do tumor vai exercendo uma pressão seletiva interna, num padrão evolutivo semelhante ao Darwiniano, responsável por selecionar as células que têm vantagem competitiva naquele ambiente, contribuindo, assim, para a criação de heterogeneidade intratumoral (23;24).

### **2.3. Fatores de risco**

Um fator de risco é algo que aumenta a probabilidade de desenvolvimento de uma doença. Contudo, verificar um fator de risco ou um conjunto deles não implica necessariamente que a pessoa vá desenvolver a doença que lhes está associada (25).

O CM é uma doença complexa de origem multifatorial. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento desta doença são enumerados de seguida.

#### **2.3.1. Idade**

O risco de desenvolver CM aumenta com a idade, contudo, por si só, a idade não é um bom preditor de risco, tendo em consideração que existem outros fatores que, quando combinados com a idade, podem aumentar ou diminuir o risco de uma mulher vir a desenvolver CM, constatando-se que o tecido mamário não envelhece linearmente com o tempo (26).

De um modo geral, as taxas de incidência aumentam rapidamente durante a quarta década de vida, tornando-se substanciais antes dos 50 anos. Após a menopausa, as taxas de incidência continuam a aumentar com a idade, mas de forma menos preponderante (27;28).

Quanto mais tempo uma mulher viver sem cancro, menor é o risco de o desenvolver posteriormente, sendo importante referir que o CM é incomum em idades mais jovens. Existem, contudo, subgrupos de mulheres que têm um risco superior às restantes, nomeadamente aquelas que têm uma forte componente familiar da doença (29).

### **2.3.2. Fatores de risco reprodutivo: Idade da menarca e da menopausa**

A menarca e a menopausa delimitam o período de atividade ovárica relacionada com a reprodução (período fértil), no qual o ovário é responsável pela produção de hormonas esteroides que vão afetar diretamente o desenvolvimento e a função da mama (30).

Vários estudos parecem suportar a associação de que ter a menarca precocemente (antes dos 12 anos) e a menopausa tardiamente (depois dos 55 anos) está associado a um aumento no risco de desenvolver CM. Este aumento do risco poderá ser devido a um aumento do tempo de exposição às hormonas sexuais (27;31).

### **2.3.3. Idade na 1ª gravidez**

Nas mulheres, a gravidez em idade jovem reduz em 50% a probabilidade de desenvolvimento de CM a longo prazo, em comparação com mulheres nulíparas, verificando-se que mulheres que têm o primeiro filho depois dos 30 anos têm praticamente o dobro do risco de desenvolver CM face às mulheres que tiveram o seu primeiro filho por volta dos 20 anos (32;33).

Uma gravidez precoce parece ser capaz de provocar modificações epigenéticas persistentes e com memória de longo prazo nas células epiteliais mamárias, capazes de reorganizar a acessibilidade à cromatina e, conseqüentemente, modular a expressão génica destas células, potencialmente controlando a expressão de oncogenes (34;35).

Para além de uma primeira gravidez em idade mais jovem, também um maior número de gravidezes se constatou resultar numa redução do risco de desenvolvimento de CM, verificando-se serem as gravidezes de duração igual ou superior a 34 semanas aquelas que estavam associadas a uma redução mais substancial do risco a longo prazo de desenvolvimento de CM (36).

### **2.3.4. História familiar**

A maioria dos casos de CM são casos esporádicos, verificando-se que apenas cerca de 5% dos casos estão associados a mutações nas células da linha germinativa (tumores hereditários). A causa mais comum de CM hereditário é uma mutação nas células da linha germinativa no gene BRCA1 ou BRCA2, mas outras mutações genéticas nos genes ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11 e PALB2 também podem conduzir a este tipo de tumores, embora sejam menos comuns e a maioria delas não aporte um risco tão elevado de CM quanto as mutações nos genes BRCA (37;38). Os portadores de mutações nos genes BRCA tendem a desenvolver cancros biologicamente mais agressivos, comparativamente aos casos de CM esporádicos (39).

Mulheres que não tenham história pessoal de CM mas que preencham algum dos seguintes critérios têm um risco aumentado de desenvolver a patologia, nomeadamente: ter um parente de 1º grau do sexo feminino diagnosticado com CM antes dos 40 anos; ou um parente de 1º grau do sexo masculino diagnosticado com CM em qualquer idade; ou um parente de 1º grau com CM bilateral em que a manifestação primária foi diagnosticada com menos de 50 anos; ou dois parentes de 1º grau, ou um parente de 1º grau e um de 2º grau, diagnosticados com CM em qualquer idade; ou um parente de 1º ou 2º grau diagnosticado com CM em qualquer idade e um parente de 1º ou 2º grau diagnosticado com cancro do ovário em qualquer idade (um deles deve ser parente de primeiro grau); ou três parentes de 1º ou 2º grau diagnosticados com CM em qualquer idade (40).

É relevante referir que ter múltiplos membros da família afetados pode não ser indicativo de que haja um elevado risco, se a mulher for proveniente de uma família numerosa (41).

### **2.3.5. Exposição à radiação**

Diversos estudos têm demonstrado que mulheres que tenham sido diagnosticadas com Linfoma de Hodgkin na infância e para o qual tenham recebido radioterapia no peito (região supradiaphragmática), têm um risco aumentado de, anos mais tarde, vir a desenvolver CM, sendo o risco proporcional à dose de radiação usada na exposição (42-44). Verificou-se ainda que mulheres que receberam irradiação do peito juntamente com quimioterapia tinham um risco superior de desenvolver CM, face a mulheres tratadas sem radioterapia, mas inferior ao das mulheres tratadas apenas com radioterapia (45).

De acordo com John e colaboradores (2007), o risco de desenvolver CM está presente não apenas quando a exposição do peito à radiação acontece para o tratamento de um cancro prévio, mas também quando a exposição acontece para efeitos de rastreio ou monitorização de tuberculose ou pneumonia.

Está também documentado o risco de desenvolver CM decorrente da exposição à radiação libertada pela explosão da bomba atómica nas cidades de Hiroshima e Nagasaki, sobretudo nas mulheres expostas nas primeiras três décadas de vida, com uma forte relação dose-resposta (46;47).

### **2.3.6. Estilo de vida**

É sobejamente conhecido que a probabilidade de desenvolver CM é afetada de forma bastante significativa pelo estilo de vida que se adota ao longo da vida (48). Vários são os

fatores relacionados com o estilo de vida que são capazes de modificar o risco de vir a desenvolver CM, alguns dos quais serão abordados de seguida.

### **2.3.6.1. Dieta**

Uma alimentação equilibrada faz parte da receita para minimizar o risco de desenvolver CM. De entre as várias estratégias nutricionais estudadas, a dieta mediterrânea parece ser aquela que mais vezes é referida como tendo o potencial de reduzir o risco de CM.

Embora existam diversos tipos de dietas mediterrâneas, em função do país que circunda a bacia mediterrânea, todas elas têm em comum um padrão alimentar à base de plantas, rico em frutas, legumes e grãos integrais, incluindo frutos secos e azeite como fonte de gorduras monoinsaturadas, ingestão limitada de carnes vermelhas, alimentos processados, refinados e com elevado teor de gordura saturada. Este tipo de regime alimentar constitui uma fonte abundante de vários compostos bioativos, incluindo antioxidantes e ácidos gordos mono e polinsaturados (49-51).

### **2.3.6.2. Peso e atividade física**

O efeito da obesidade no risco de CM é complexo, diferindo entre as mulheres em pré e pós-menopausa (PM), constatando-se que, antes da menopausa, existe uma relação de risco inversa em que a obesidade parece ser protetora, particularmente para mulheres jovens, enquanto que, no PM, existe uma associação de risco positiva (52;53).

Antes da menopausa, a maioria dos estrogénios são produzidos nos ovários e os seus níveis sanguíneos estão sobre regulação homeostática não influenciada diretamente pela percentagem de gordura corporal. No período PM, o tecido adiposo, considerado um órgão com funções metabólicas e endócrinas, constituirá a principal fonte da biossíntese de estrogénios (52;54).

A obesidade PM provoca um processo inflamatório crónico de múltiplos depósitos de tecido adiposo branco, incluindo o do peito, gerando alterações profundas ao nível da biologia dos adipócitos. Os fatores inflamatórios produzem e condicionam a sinalização dos estrogénios ao provocarem um aumento da expressão da enzima aromatase, responsável pela conversão dos androgénios a estrogénios, resultando num aumento da biossíntese dos últimos. A produção aumentada de estrogénios a nível do tecido adiposo periférico resultará em maiores concentrações plasmáticas, o que terá como consequência a saturação das globulinas de ligação a hormonas sexuais e, por isso, uma maior distribuição. Este aumento provoca uma hiperativação do recetor nuclear dos estrogénios, ativando vias biológicas que controlam uma grande variedade de funções celulares como o crescimento, a apoptose, a migração celular e

a angiogénese, estando, assim, associado ao desenvolvimento de carcinogenicidade mamária (53;55;56). Ter um elevado índice de massa corporal no período PM foi ainda associado a fenótipos de CM positivos para o recetor estrogénio (RE) e recetor da progesterona (RP) (57;58).

Para além da hiperestrogenémia e da inflamação crónica do tecido adiposo branco, a obesidade foi ainda associada a um outro conjunto de mecanismos biológicos associados à oncogénese mamária como sejam a resistência à insulina e alteração dos níveis de adipocinas, pelo que a realização de atividade física para controlo do peso corporal se revela essencial (59;60).

### **2.3.6.3. Ingestão de álcool**

O consumo de álcool é um fator de risco estabelecido e modificável para o desenvolvimento de CM, constatando-se que mesmo baixos níveis de consumo de álcool estão associados a um aumento ligeiro do risco, sendo a medida mais robusta a ingestão cumulativa de álcool ao longo da vida (61;62). De acordo com Chen e os seus colaboradores (2011), mesmo consumos de álcool tão baixos quanto 3 a 6 copos de vinho por semana parecem estar associados a um aumento ligeiro no risco de CM, não tendo sido verificadas diferenças em função do tipo de bebida alcoólica.

O acetaldeído constitui o principal e mais tóxico metabolito do etanol, sendo considerado como um agente carcinogénico. Sabe-se, contudo, que também o etanol pode estimular a carcinogénese ao inibir a metilação do DNA e interagir com o metabolismo dos retinoides (63).

O mecanismo pelo qual o consumo de álcool aumenta o risco de CM não é certo, mas pensa-se que possa estar relacionado com aumento dos níveis plasmáticos de estrogénios e androgénios, quer em mulheres pré-menopáusicas quer em mulheres pós-menopáusicas. Este aumento dos níveis plasmáticos das hormonas sexuais poderá acontecer por diversas vias, nomeadamente: aumento da atividade da aromatase, efeitos na produção de hormonas adrenais ou ainda decréscimo no metabolismo hepático dos androgénios (61;64).

Alguns estudos parecem suportar a hipótese de que consumo de álcool aumenta o risco de desenvolvimento de CM RE+ ou RE+/RP+ (65-67).

### **2.3.7. Contracetivos orais**

A associação entre o risco de CM e o uso de contracetivos não é clara. A maioria dos estudos parecem demonstrar que os aumentos no risco são pequenos, sendo maiores entre as mulheres que usam atualmente ou usaram recentemente este método contracetivo,

comparativamente às mulheres que, tendo usado no passado, já não usam. Demonstrou-se ainda que o risco era superior entre aquelas mulheres que usaram a contraceção oral por longos períodos de tempo, por comparação com as mulheres que os usaram por curtos períodos de tempo, não parecendo haver evidências de que o risco de CM varie significativamente com a composição da formulação contracetiva oral combinada (68-70). Apesar do ligeiro aumento no risco observado nas utilizadoras atuais, o risco parece tender a desaparecer ao fim de 5 anos de descontinuação do seu uso (71;72).

### **2.3.8. Terapêutica de reposição hormonal**

A transição para a menopausa ocorre tipicamente entre os 40 e os 60 anos e é caracterizada pela perda natural relacionada com a idade da atividade dos folículos ováricos, conduzindo a um decréscimo nos níveis endógenos de estrogénios, progesterona e testosterona, estando associada a um conjunto de sintomas como afrontamentos, mudanças de humor, suores noturnos, disfunção sexual, entre outros. Na tentativa de controlar estes sintomas, são administrados regimes de terapêutica de reposição hormonal (TRH) que podem ser divididos em TRH convencional com estrogénios e progestagénios ou apenas com estrogénios e TRH com hormonas bio idênticas. Ainda que aparentemente mais seguras e eficazes, não foi provado que as hormonas bio idênticas tenham menos efeitos secundários que as hormonas de síntese, pelo que deverão ser consideradas como tendo os mesmos riscos de saúde que as outras TRH (73-75).

Apesar dos benefícios associados à TRH, como sejam diminuição do risco de osteoporose e DCVs, verifica-se que esta está associada a um aumento do risco de CM (76-78). Este aumento no risco parece aplicar-se sobretudo às mulheres que usaram recentemente ou que usam atualmente TRH, aumentando com o tempo de uso da mesma e diminuindo após a cessação do uso, sendo praticamente nulo 5 anos após a cessação (79). Este risco pode ser estratificado em função do tipo de formulação administrada, sendo maior para preparações de estrogénios com progestagénios diários, face a preparações de estrogénios com administração intermitente de progestagénios, por sua vez maior que para formulações contendo apenas estrogénios (80). Assim, é importante balancear caso a caso os benefícios e malefícios associados a esta terapêutica antes da decisão clínica da sua prescrição (81).



### 3. Caracterização dos subtipos moleculares de cancro da mama

#### 3.1. Luminal A

O CM luminal A é o subtipo mais comum, representando 50% a 60% dos diagnósticos, e é também o subtipo que apresenta o melhor prognóstico, sendo, assim, considerado um cancro de baixo risco (82-84).

Em termos de perfil imunohistoquímico, este subtipo molecular caracteriza-se pela expressão do RE, RP, Bcl-2, citoqueratinas 8 e 18, ausência da amplificação/supereexpressão do recetor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) e baixos níveis de Ki67, tendo um baixo grau histológico. Em termos de expressão génica, caracteriza-se pela expressão de genes regulados pela sinalização nuclear do RE que atua como um fator de transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (82;85).

Os genes mais frequentemente mutados no subtipo luminal A são o PIK3CA, MAP3KI, GATA3, TP53 e CDHI (86;87). Em comparação com o subtipo luminal B, este subtipo molecular apresenta menor número de mutações no genoma, menor número de alterações no número de cópias dos cromossomas, menos mutações no gene TP53 (12% vs. 29%), níveis similares de mutações no GATA3 e mais mutações no PIK3CA (45% vs. 29%) e MAP3KI (13% versus 5%) (83).

#### 3.2. Luminal B

O CM luminal B caracteriza-se por uma baixa expressão de RP (< 20% das células), baixa expressão do gene FOXA1, alta expressão de genes relacionados com a proliferação/ciclo celular (genes CCNBI, MKI67 e MYBL2) e por um alto grau histológico, comparativamente ao subtipo luminal A (83;88-90).

O Ki67 (codificado pelo gene MKI67) é um marcador nuclear de proliferação celular cuja presença em níveis elevados está associada a piores resultados. Para este marcador, foi definido um *cutoff* de 14%, determinado por método imunohistoquímico, para distinguir entre o subtipo luminal A e luminal B. Assim, o subtipo luminal B define-se como sendo RE positivo e/ou PR positivo, negativo para o HER2 e por ter alto Ki67 ( $\geq$  14% das células). Contudo, verifica-se que alguns tumores luminal B têm elevada expressão de genes associados ao HER2, como sejam o ERBB2 e o GRB7, definindo um subgrupo de tumor luminal B positivo para o recetor HER2 que representa apenas 30% dos casos de CM de subtipo luminal B (88;91).

Quanto ao recetor de estrogénios, este é expresso de forma semelhante nos dois subtipos luminiais, servindo apenas para distinguir a doença luminal da não luminal (83).

Os genes mais frequentemente mutados neste subtipo molecular são o TP53 e o PIK3CA (29%), o GATA3 (13%) e o TTN (12%). Paralelamente às mutações no TP53, frequentemente o subtipo luminal B apresenta outros eventos que podem intervir em etapas da mesma via de sinalização, incluindo a perda de ATM e a amplificação de MDM2 (86;87).

No que respeita ao prognóstico, o subtipo luminal B caracteriza-se por um comportamento clínico mais agressivo, um prognóstico semelhante ao dos tumores não luminais e diferente padrão de resposta à terapêutica hormonal e quimioterapia, face ao subtipo luminal A (88;92;93).

### **3.3. Enriquecido em HER2 (HER2+)**

O HER2 é uma glicoproteína transmembranar com domínio tirosina cinase codificada pelo oncogene HER2 / ERBB2 / neu, localizado na região cromossômica 17q, e pertencente à família de recetores do fator de crescimento epidermal (RFCE), a qual inclui quatro membros: ERBB1, ERBB2, ERBB3 e ERBB4 (94-96). A ativação do recetor HER2 gera a ativação de vias de sinalização que incluem a Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt (97).

A amplificação deste recetor define a categoria dos tumores clinicamente positivos para o HER2, sendo importante ressaltar a heterogeneidade destes tumores que tanto podem ser incluídos no subtipo molecular enriquecido em HER2 como no subtipo luminal, em função da sua expressão do RE (88;89).

Os tumores representativos deste enriquecimento em HER2 demonstraram ter uma expressão alterada de outros genes do amplicão 17q12-21, entre eles TCAP, PNMT, PGAP3, MIEN1 e GRB7 (98-100). Para além disso, demonstraram ainda ter uma elevada frequência de mutações nos genes TP53 e PIK3CA (86).

Este recetor encontra-se amplificado em aproximadamente 20% a 30% dos casos de CM, sendo uma glicoproteína que desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação (via inibição da apoptose), sobrevivência e diferenciação celulares (85;96).

O HER2 é o parceiro de dimerização preferencial de todos os outros RFCE, quer em células normais quer nas células tumorais. Destas dimerizações, resultará a ativação, entre outras vias de sinalização, da via de proliferação celular Ras/Raf/MAPK e da de sobrevivência celular PI3K/Akt. É o dímero formado entre o HER2 e o HER3 que parece ser o principal responsável por ativar a via PI3K/Akt, sendo ainda possível uma ativação direta da mesma, de forma independente de HER3, no contexto de uma auto-fosforilação constitutiva das tirosinas c-terminais do HER2, no âmbito de níveis elevados de amplificação de HER2 (96;101;102).

Estes tumores caracterizam-se ainda pela elevada expressão de genes envolvidos na via de sinalização Ras, como sejam as GTPases relacionadas com a Ras, RALB e RAB6A, tendo

sido associados a cancros mais agressivos, de maiores dimensões, com crescimento mais rápido e maior probabilidade de metastizar, ou seja, tumores com pior prognóstico (103;104).

### 3.4. Subtipo basal

Os tumores do subtipo basal (TSB) caracterizam-se por um perfil de expressão génica que é semelhante ao observado nas células da camada basal/mioepitelial da mama saudável, com sobreexpressão de marcadores como as citoqueratinas (CK) basais de alto peso molecular (CK 5/6, CK 14 e CK 17), RFCE, vimentina, p-caderina, fascina, caveolinas 1 e 2, proteína  $\alpha\beta$ -cristalina e c-KIT (105;106). Para além disso, apresentam mutações frequentes nos genes TP53 e BRCA1, desregulação nos genes de resposta imune e desregulação nas vias de sinalização MAPK, PI3K/Akt e NF- $\kappa$ B, o que tem como consequência alterações na proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular, manifestando ainda inativação da via de sinalização Rb (via envolvida na supressão tumoral). Tudo isto demonstra a instabilidade genómica associada a estes tumores (106;107).

Muitos TSB parecem estar associados a uma disfunção na via de sinalização BRCA1, causada por metilação do promotor deste gene e consequente inativação transcricional. Tendo em consideração que a expressão de BRCA1 é importante para os processos de reparação de DNA, ativação de *checkpoints* do ciclo celular e manutenção da estabilidade cromossómica e que estes fenómenos se encontram alterados nos tumores de subtipo basal, parece existir uma ligação entre um fenótipo de subtipo basal e mutações no gene BRCA1 (108;109).

Estudos relatam ainda que neste subtipo ocorre uma ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, com acumulação nuclear e citosólica de  $\beta$ -catenina, um cofator transcricional que é capaz de regular a transcrição de um número de genes alvo, como seja o oncogene c-myc. Tal foi associado a um pior resultado, tendo sido mais frequentemente detetado em carcinomas do tipo basal *in situ*, sugerindo, assim, que a ativação desta via poderá representar um evento precoce no desenvolvimento de TSB, sendo preditivo de pior prognóstico e constituindo um atrativo alvo farmacológico (110).

Os TSB partilham poucas semelhanças com os outros subtipos moleculares e são detentores de uma grande diversidade intrínseca (105;111;112). Tal diversidade pode ser explicada, em parte, pelo facto de cerca de 77% dos tumores do tipo basal serem triplo negativos (TN) e de ter sido observada a expressão de RE e a amplificação de HER-2 nos cerca de 23% de tumores basais que não são TN. Contudo, dentro dos tumores classificados como TN, apenas 71% são do subtipo basal, pelo que estes termos não podem ser usados como sinónimos (105).

Em termos de prevalência, cerca de 12% a 20% dos CM têm um perfil de expressão génica tipo basal e/ou imunofenótipo TN, estando estes diagnósticos associados a um pior prognóstico, tumores com maior grau histológico e maior capacidade proliferativa (113;114).

Os tumores TN caracterizam-se pela ausência de expressão do RE, RP e HER2 e podem ser divididos em 6 subtipos distintos, cada um exibindo características biológicas únicas. Estes subtipos incluem dois tipos basais (TSB1 e TSB2), um imunomodulador (IM), um mesenquimal (M), um mesenquimal tipo estaminal (MSL) e um subtipo recetor androgénio luminal (LAR) (115).

### **3.5. Baixo em Claudina**

Para além dos subtipos intrínsecos mencionados, foi ainda descrito um subtipo baixo em claudina, caracterizado por uma baixa a ausente expressão de marcadores de diferenciação luminal, enriquecimento em marcadores de transição epitelial-mesenquimal, genes de resposta imune e características semelhantes a células estaminais cancerígenas. Este subtipo caracteriza-se por uma baixa expressão de claudina 3, 4, 7, ocludina e E-caderina, proteínas envolvidas nas *tight junctions* e adesão célula-célula. Clinicamente, a maioria destes tumores são TN, compostos maioritariamente pelos subtipos M e MSL, tendo uma resposta à quimioterapia que é intermédia entre os tumores luminais e os TSB (116;117).

Comparativamente aos restantes subtipos moleculares, o subtipo baixo em claudina demonstra uma expressão inconsistente de citoqueratinas basais (CK 5, 14 e 17), baixa expressão de HER2 e de marcadores luminais (RE, RP, GATA-3, CK 18 e 19) (116).

## **4. Diagnóstico e tratamento do cancro da mama – atuais limitações**

O tratamento do CM teve a sua génese com a mastectomia de Halsted's, por volta de 1880, ao que se seguiu a cirurgia conservadora da mama com igual resultado, no que respeita ao controlo da doença, mas menor impacto estético. Por volta de 1980, é introduzida a quimioterapia que, embora tenha sido um marco importante, aporta a desvantagem de não beneficiar todos os pacientes (118).

Em 2000, o trabalho de Perou e dos seus colaboradores que consistiu na análise dos padrões de expressão génica de espécimes de CM de 42 pessoas diferentes, tendo analisado 8 102 genes, permitiu identificar características comuns que levaram ao agrupamento das amostras, com base nas diferentes características moleculares da biologia das células epiteliais mamárias, em quatro grupos. Este trabalho foi fundamental pois abriu portas a posteriores pesquisas que conduziram à atual classificação do CM em subtipos moleculares, permitindo a

administração de terapêuticas direcionadas, por exemplo, terapêutica hormonal para tumores que sejam positivos para recetores hormonais ou terapêuticas direcionadas à amplificação de HER2.

A personalização da terapêutica decorrente desta classificação em subtipos moleculares constituiu um marco importantíssimo no tratamento do CM, permitindo uma melhoria dos resultados clínicos. Contudo, dada a heterogeneidade intratumoral referida em 2.2., dois doentes cujo tumor seja classificado como pertencendo a um mesmo subtipo podem não responder da mesma forma à terapêutica padrão. Assim, torna-se necessário individualizar o regime de tratamento do indivíduo, em função daquelas que sejam as idiosincrasias da sua manifestação da doença. É com o objetivo de satisfazer esta premissa que surge a medicina de precisão (MP).

A MP atua através do conhecimento dos biomarcadores (composição molecular), das características genéticas e fenotípicas do tumor para individualizar o regime de tratamento e, assim, mudar de uma abordagem “*one size fits all*” para uma abordagem direcionada em que temos o medicamento correto, na dose correta e no doente correto. Esta iniciativa foi lançada em janeiro de 2015 pelo presidente dos Estados Unidos Barack Obama e com ela visa-se aumentar a eficácia, diminuir a toxicidade e ter uma gestão da doença que seja mais custo-efetiva (5;119-121).

## **5. Biomarcadores moleculares de cancro da mama e respetiva terapêutica direcionada**

Um biomarcador funciona como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou resposta a exposições ou intervenções, incluindo terapêuticas (122). Pela análise da composição molecular de cada um dos subtipos de CM e vias de sinalização que estão ativas, surgem potenciais novos alvos de terapêuticas direcionadas que poderão estar associados à resistência às terapêuticas convencionais e que poderão constituir novos biomarcadores de evolução da doença (123). De seguida, apresentam-se algumas das estratégias terapêuticas direcionadas mais promissoras.

### **5.1. Inibidores das cinases 4/6 dependentes de ciclina**

Os inibidores das cinases 4/6 dependentes de ciclina (CDK) controlam a transição entre as fases G<sub>1</sub> e S do ciclo celular ao provocarem um “*turn off*” das cinases e, conseqüentemente, desencadearem a desfosforilação da proteína Rb que, assim, terá uma ação supressora tumoral. Na ausência de inibidor, a ciclina D associa-se à CDK 4/6 possibilitando

que esta fosforile a Rb, o que inativa esta proteína resultando na libertação do fator de transcrição E2F do controlo da Rb e promovendo a transcrição de genes necessários para a replicação do DNA (124;125).

É importante notar que a desregulação das proteínas do ciclo celular acontece de forma diferente de acordo com o subtipo de CM. Por exemplo, a amplificação da ciclina D1 (CCND1) ocorre numa percentagem muito maior no CM luminal B do que no luminal A. Da mesma forma, o subtipo luminal B está mais frequentemente associado a um ganho de CDK4. Por outro lado, os CM do tipo basal geralmente não apresentam alterações na ciclina D1 ou CDK 4/6, mas 20% dos casos contém mutações ou perda homozigótica de RB1, indicando que este subtipo de CM pode responder com menos frequência ao tratamento com inibidores de CDK 4/6 (86).

Pelos motivos acima mencionados, a CDK 4/6 torna-se num alvo atrativo, devido ao seu papel central na fosforilação da Rb e ao facto de estar frequentemente desregulada nas células tumorais (86;126).

Devido à interação complexa entre o ciclo celular e a sinalização do RE e do HER-2, o uso dos inibidores da CDK 4/6 poderá ter uma ação sinérgica com a terapêutica endócrina e anti HER-2, bem como ser um mecanismo para ultrapassar a resistência às mesmas (127;128).

Alguns inibidores da CDK 4/6 já aprovados no tratamento do CM avançado e com metástases são o palbociclib, ribociclib e abemaciclib, tendo demonstrado eficácia na melhoria da progressão livre da doença, quer em monoterapia quer associados a outras moléculas (129-133).

## **5.2. Inibidores da via PI3K/Akt/mTOR**

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR desempenha um papel essencial no controlo do ciclo celular, sobrevivência, metabolismo e proliferação, promovendo ainda a angiogénese e recrutamento de células inflamatórias (134). A ativação desta via de sinalização é iniciada pela estimulação a montante da família de recetores com atividade de tirosina cinase (RTK), a qual inclui os RFCE (135) e parece estar associada a resistência à terapêutica hormonal, terapêutica anti HER-2 e quimioterapia (136).

Existem 3 classes de PI3K, cada uma com diferentes preferências de substratos, sendo a classe IA de PI3Ks a que mais preocupação gera no cancro. Pela ação da PI3K classe I, o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) é fosforilado a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 contém um local de acoplamento para Akt e da ligação destes dois resulta a fosforilação da Akt, uma serina/treonina cinase que constitui o mediador central da via PI3K. Uma vez

fosforilada, a Akt conduz à ativação do mTORC1, uma das formas funcionais do complexo mTOR (137;138). O mTORC1 promove a transcrição de RNA ribossómico, conduzindo à biossíntese de ribossomas e, conseqüentemente, promove a síntese proteica; inibe a autofagia; regula a síntese de lípidos; e promove a síntese de nucleótidos de purinas e pirimidinas essenciais para a construção do DNA e RNA. O mTORC2, outra forma funcional do complexo mTOR, por sua vez, está simultaneamente envolvido na organização da actina no citoesqueleto e na regulação da fosforilação da Akt (139;140).

A via de sinalização PI3K encontra-se frequentemente ativada de forma aberrante no CM, com mutações em cerca de 25% dos casos, sendo a maioria das mutações no gene PIK3CA que codifica para a subunidade catalítica p110 $\alpha$  da PI3K. Estas mutações aumentam a atividade enzimática, potenciam os elementos de sinalização a jusante, incluindo a Akt, e promovem a transformação oncogénica (135).

Os inibidores da via PI3K que estão em desenvolvimento representam uma promissora abordagem terapêutica e podem ser agrupados, de acordo com a sua especificidade, em inibidores PI3K puros, compostos que bloqueiam dualmente a PI3K e o mTOR, inibidores catalíticos puros do mTOR e inibidores da Akt (135;141).

Dois compostos que estão a ser desenvolvidos pela Exelixis e pela Sanofi-aventis são o XL147 (Pilaralisib) e o XL765. O XL147 é um inibidor seletivo (inibidor pan) da PI3K classe I administrado oralmente em tumores sólidos (142). O XL765 é um inibidor dual da PI3K e do mTOR que tem a capacidade de atuar sobre mTORC1 e mTORC2, contrariamente aos análogos da rapamicina que atuam apenas sobre o mTORC1 (143).

A rapamicina e os seus análogos (temsirolimus, everolimus e ridaforolimus) são antagonistas específicos do mTOR que vão bloquear a sinalização a jusante desta via, resultando no bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>. Estes compostos demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de uma grande variedade de tumores sólidos, incluindo o CM, em avaliações pré-clínicas e clínicas, tendo alguns deles já sido aprovados pela FDA para uso humano (136).

AZD5363 é um inibidor da Akt competitivo com o ATP, capaz de inibir todas as isoformas da mesma (144). O MK-2206 funciona como um inibidor alostérico da Akt e demonstra uma atividade anti-tumoral sinérgica com outras moléculas usadas em terapia direcionada (145). Outros inibidores desta enzima que se encontram em desenvolvimento clínico para o tratamento do cancro são perifosina, RX-0201, PBI-05204, GSK2141795, entre outros (146).

### 5.3. Inibidores da via Ras/Raf/MEK/ERK

Esta via constitui um efetor a jusante da sinalização do RFCE/HER2, regulando a expressão génica das células e, assim, prevenindo a apoptose (147;148).

A Ras é uma proteína de ligação a nucleótido de guanina associada à membrana que ativa, entre outras vias, a via PI3K/Akt/mTOR e a via Raf/MEK/ERK. A proteína Ras recruta a proteína serina/treonina cinase Raf para a membrana plasmática onde esta será depois capaz de fosforilar e ativar a MEK1 e MEK2 que, por sua vez, vão fosforilar e ativar a ERK1 e ERK2. A ERK fosforilada (pERK) funciona como um componente chave da sinalização a jusante da via Ras/Raf/MEK/ERK, sendo translocada para o núcleo onde vai fosforilar e ativar proteínas efetoras e fatores de transcrição, como seja a família de fatores de transcrição Ets (Elk-1), entre outras, resultando em diferentes respostas celulares, nomeadamente proliferação celular (149-151).

Estudos pré-clínicos sugerem que esta via de sinalização se encontra ativa de forma mais preponderante nos tumores TN, face aos outros subtipos moleculares, constituindo, assim, um potencial alvo para este tipo de tumores. Contatou-se que a hiperatividade desta via parece estar associada a mutações dos genes KRAS, NRAS e BRAF (152;153).

PD-0325901 é um inibidor de segunda geração seletivo e não competitivo da MEK 1 e 2 que esteve em ensaios clínicos, tendo demonstrado maior eficácia em modelos pré-clínicos que o inibidor MEK CI-1040 que parou o seu desenvolvimento na fase 2 dos estudos clínicos devido a insuficiente eficácia. Contudo, também o desenvolvimento do PD-0325901 parou devido a problemas de segurança. O Selumetinib (AZD6244) é outro inibidor seletivo e não competitivo da MEK 1 e 2 que se encontra atualmente em ensaios clínicos (154-156).

A via Ras/Raf/MEK/ERK e a via PI3K/Akt/mTOR encontram-se interligadas na sua sinalização, o que faz com que bloquear ambas as vias possa resultar numa maior eficácia anti tumoral, face ao bloqueio de apenas uma (157-159). Nesse sentido, foi desenvolvido o HA-ADT uma molécula dadora de H<sub>2</sub>S que tem a capacidade de suprimir o crescimento das células tumorais através da inibição dual das vias de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR, induzindo, assim, a sua apoptose através do efeito de elevadas concentrações de H<sub>2</sub>S (160).

### 5.4. Inibidores da PARP

Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) é uma família de enzimas cuja ativação acontece na sequência de danos no DNA e cuja atividade determina modificações pós transcricionais de proteínas nucleares como as histonas, num processo designado de *PARylation*, que vai descondensar a cromatina em torno dos locais danificados, bem como recrutar enzimas reparadoras do DNA (161-163).



Foram já identificados 18 elementos desta família, na qual PARP-I surge como sendo a proteína mais ativa com a capacidade de responder a vários tipos de danos no DNA. O polímero de ADP-ribose sintetizado pela PARP atua como uma bandeira sinalizadora dos locais de DNA danificados, conduzindo à ligação do complexo de reparação do DNA dependente da PARP aos mesmos, promovendo a reparação de ruturas de cadeias simples (RCS) por excisão de bases (EB) (161;163;164).

Perante a inibição da PARP, acumular-se-ão intervalos de cadeia simples no DNA. Se estes intervalos forem encontrados pela forquilha de replicação, ela poderá ficar presa neles e poderá ocorrer a sua degeneração em ruturas de cadeia dupla que, normalmente, são reparadas por recombinação homóloga (RH), num processo que envolve a BRCA1 e BRCA2. Desta forma, mediante a presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, a forquilha de replicação não pode ser reiniciada e colapsa, gerando-se quebras persistentes na cromatina que acabam por culminar na apoptose das células. Assim, a administração de inibidores da PARP demonstra ter um marcado efeito citotóxico *in vitro* e *in vivo* em células tumorais que tenham uma deficiência intrínseca no processo de RH, como acontece nos portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, praticamente não exercendo efeito nas células cujas proteínas BRCA se mantêm funcionais (165;166). Para além disso, os inibidores da PARP demonstram ainda ter interesse para aumentar o efeito da quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (167).

Olaparib (AZD2281), niraparib (MK4827), talazoparib (BMN 673) e rucaparib (AG014699) são potentes inibidores da PARP, alguns ainda em fase de estudos clínicos, administrados por via oral, em monoterapia ou em combinação com outros agentes, em tumores portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (168-172).

## **6. Testes moleculares**

Tendo em consideração que o CM não é uma doença mas um conjunto de doenças que se revestem de uma grande heterogeneidade e que “talvez” não é uma resposta considerada aceitável, importa recorrer a um conjunto de ferramentas que nos permitam melhor perceber a biologia de cada tumor e, assim, conceber uma prescrição terapêutica que seja direcionada às necessidades de cada paciente.

### **6.1. Sequenciação de nova geração**

Sequenciação de nova geração (NGS) ou sequenciação em paralelo massiva são termos relacionados que se referem a uma tecnologia de alta resolução que proporciona a

sequenciação em simultâneo de milhões de pequenos fragmentos de DNA ou RNA com elevada velocidade, precisão e rendimento (173;174).

Esta tecnologia permite uma grande variedade de aplicações nomeadamente estabelecer perfis de expressão génica, contagem de cromossomas, deteção de alterações epigenéticas e análises moleculares. Desta forma, a NGS surge como uma ferramenta importantíssima para auxiliar na descoberta de doenças e desenvolvimento da medicina de precisão, permitindo moldar a terapêutica em função das alterações detetadas (farmacogenómica) (173;174).

A NGS pode ser usada para sequenciar genomas inteiros, apenas os 22 000 genes codificantes para proteínas, todo o transcriptoma ou um pequeno número de genes individuais (173).

#### **6.1.1. Sequenciação da totalidade do genoma**

Na sequenciação da totalidade do genoma (WGS), cada um dos 3 bilhões de bases do genoma humano é sequenciado, obtendo-se informação quanto às regiões codificantes (exões) e não codificantes (intrões). Assim, torna-se possível detetar alterações estruturais dos genes que ocorram no genoma fora das regiões exónicas codificantes, como sejam variações que ocorram em regiões do DNA contendo elementos reguladores da transcrição, como os potenciadores ou os silenciadores genéticos, bem como variações responsáveis por afetar os fenómenos de *splicing* alternativo. Estes dados serão, contudo, de certa forma, mais difíceis de interpretar já que as consequências clínicas de mutações a nível das regiões intrónicas ainda não são muito claras (174;175).

#### **6.1.2. Sequenciação da totalidade do exoma**

A sequenciação da totalidade do exoma (WES) determina a sequência das regiões exónicas do DNA codificantes para proteínas. Tendo em consideração que mutações nos exões se podem refletir em anomalias na estrutura e função das proteínas que estes codificam, estas mutações tornam-se mais fáceis de interpretar, face às mutações nas regiões intrónicas não codificantes. Assim, esta análise é importante já que, embora a região exónica codificante represente apenas 1% do genoma, cerca de 85% das mutações com significado patológico ocorrem a este nível, permitindo identificar as potenciais causas genéticas de doenças humanas (176;177).

A sequenciação do exoma proporciona uma rápida identificação de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), variações no número de cópias (CNVs), deteção de pequenas

inserções ou deleções, bem como novas mutações que possam explicar doenças complexas (175).

### **6.1.3. Análise de todo o transcriptoma**

A análise de todo o transcriptoma (WTS) permite não só identificar perfis de expressão génica como também detetar fenómenos de *splicing* alternativo, edição de RNA e deteção de transcritos previamente desconhecidos (173).

Esta análise permite identificar assinaturas de expressão génica que são características de cada tumor, bem como de cada subtipo molecular de um dado tumor. Esta análise permite ainda identificar assinaturas de expressão génica que distinguem os tumores primários das metástases, bem como assinaturas de metástases que são expressas nos tumores primários, levantando à hipótese de que estas últimas possam representar um programa metastático que é expresso apenas nos tumores primários destinados a metastizar (178-180).

Através desta análise é ainda possível identificar genes sobreexpressos ou sobrerregulados que podem estar envolvidos numa variedade de funções celulares como o metabolismo celular, organização do citoesqueleto ou sinalização celular (181). Assim, a WTS constitui uma ferramenta importante capaz de identificar genes diferencialmente expressos que podem constituir potenciais novos biomarcadores de CM, revelando-se extremamente útil do ponto de vista da MP.

### **6.1.4. Sequenciação direcionada**

A sequenciação direcionada permite determinar a sequência de genes específicos ou regiões genómicas, detetando novas variantes, bem como variantes já conhecidas, contribuindo para melhorar as estratégias de terapêutica direcionada para o CM (182).

## **6.2. Assinaturas de expressão génica**

Nos últimos anos, testes que identificam assinaturas de expressão génica dos tumores têm sido desenvolvidos e cada vez mais utilizados para identificar pacientes com CM em estágio inicial com maior probabilidade de beneficiar de quimioterapia adjuvante, para avaliação do risco de recidiva, bem como para classificação do tumor em subtipos intrínsecos. Alguns destes testes encontram-se explicados de seguida.

### **6.2.1. MammaPrint (70-gene assay)**

MammaPrint é um teste genómico de microarray desenvolvido pela empresa Agendia que usa os níveis de expressão de 70 genes como uma base para prever o risco de recidiva de CM em pacientes com cancro em fase inicial. Este teste está aprovado pela FDA para ser usado em mulheres de todas as idades, proporcionando resultados de nível de evidência IA suportados pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), tendo sido validado num ensaio clínico prospetivo randomizado conhecido como MINDACT (NCT00433589) (183).

Os resultados deste teste são reportados como baixo risco ou alto risco de recidiva de CM num período de 10 anos após o diagnóstico (183).

Tendo em consideração que um número significativo de pacientes com CM recebe sobretratamento, os resultados deste teste são úteis pois permitem racionar melhor os pacientes que realmente beneficiam da introdução de quimioterapia adjuvante – pacientes cujo resultado seja de alto risco genómico – e, assim, proteger os restantes pacientes dos efeitos secundários desta terapêutica adjuvante (184-186).

### **6.2.2. Oncotype Dx™**

Oncotype Dx™, também conhecido como *21-gene recurrence score*, é um ensaio de reação de polimerização em cadeia com transcriptase reversa (qRT-PCR) da empresa Genomic Health que mede a atividade de um conjunto de 21 genes relacionados com tumores, providenciando informação sobre a probabilidade de recidiva e de resposta à quimioterapia (187).

Os resultados do teste são um score de recidiva a 10 anos com valor compreendido entre 0 e 100 em que um baixo score indica que existe uma reduzida probabilidade de recidiva, bem como de beneficiar da administração de quimioterapia, enquanto que um score elevado remete para uma elevada probabilidade de recidiva e de beneficiar de quimioterapia, permitindo avaliar melhor quais os pacientes que beneficiam de indicação para quimioterapia (187).

Este teste genómico utiliza amostras do tumor que podem ser obtidas por biópsia ou por cirurgia (lumpectomia), sendo candidatos à realização desta análise genómica pacientes que tenham sido recentemente diagnosticados com CM invasivo, pacientes com tumores em estágio I, II ou IIIa e pacientes com CM RE positivo, HER2 negativo e negativos para o envolvimento de nódulos linfáticos (NL) (187-189).

### **6.2.3. Prediction Analysis for Microarrays (PAM50) (Prosigna)**

Prosigna® é um teste de diagnóstico *in vitro* desenvolvido pela NanoString Technologies que se destina a ser usado em mulheres pós-menopáusicas com tumores em estágio inicial, RH positivos, nódulos negativos (estágio I ou II) ou nódulos positivos (estágio II ou IIIa) (1 a 3 nódulos positivos), destinados a serem tratados com terapia hormonal. Este teste visa proceder à avaliação do risco de recidiva distante (metástase), sendo processado no sistema de análise NanoString nCounter® Dx que analisa, sem amplificação, mRNA isolado de uma amostra de tumor e está autorizado para ser usado nos Estados Unidos, tendo marcação de conformidade europeia (CE) para uso na União Europeia (190).

Prosigna® permite classificar os tumores num dos 4 subtipos intrínsecos. Tal é possível uma vez que os subtipos intrínsecos são biológica e clinicamente distintos, caracterizando-se por diferentes assinaturas de expressão génica. Assim, o perfil de expressão génica do tumor de cada paciente será comparado com os protótipos de assinaturas genéticas definidas para cada subtipo intrínseco por forma a definir um grau de similaridade e, desse modo, possibilitar a atribuição de uma categoria. Estes resultados, em combinação com um *score* de proliferação e o tamanho do tumor, produzem, através de algoritmo próprio, um Prosigna *score* que consiste num risco de recidiva para cada paciente. Este *score* é um valor numérico numa escala de 0 a 100 que estima a probabilidade de recidiva distante do local de manifestação primário do tumor (metástase) num horizonte temporal de 10 anos (190).

O risco de metástase conferido pelo Prosigna® providencia informação prognóstica significativa que vai além das características clínico-patológicas clássicas da doença, o que aumenta a acuidade prognóstica na sua utilização (191).

### **6.2.4. MapQuant Dx™**

MapQuant Dx™ é um teste que mede, por microarrays, a expressão de 97 genes associados a proliferação para refinar a avaliação do grau histológico do tumor, por forma a permitir reclassificar tumores de grau histológico 2 em tumores de baixo risco grau 1 ou em tumores de alto risco grau 3. É especialmente útil em casos em que informações sobre o grau do tumor são decisivas para prescrever quimioterapia, como acontece em pacientes com CM invasivo RE positivos, nódulos linfáticos negativos (192-194).

### **6.2.5. Breast Cancer Index (Theros)**

Breast Cancer Index (BCI) é uma assinatura algorítmica baseada na expressão génica e é constituído por 2 painéis de biomarcadores independentes, molecular grade index (MGI) e o rácio de 2 genes, (HOXB13/IL17BR) (H/I), que avaliam a proliferação tumoral e a sinalização

do estrogénio, respetivamente. Da integração do MGI e do rácio H/I é gerado um BCI score prognóstico que quantifica o risco de recidiva metastática precoce (0 – 5 anos) e tardia (> 5 anos), em pacientes com tumores RE+, NL-, em estágio inicial (195-199).

Para além desta componente prognóstica, o BCI tem ainda uma componente preditiva (rácio H/I) capaz de predizer o benefício de prolongar a administração de terapêutica endócrina para além dos 5 anos. Neste sentido, pacientes com elevado rácio H/I, demonstraram obter benefícios em receber tamoxifeno durante 10 anos versus 5 anos, enquanto que pacientes com baixo rácio H/I não retiram benefícios em estender a administração de terapêutica endócrina (195-199).

## **7. Genética e genómica na monitorização do efeito terapêutico e prognóstico**

### **7.1. DNA tumoral circulante**

O DNA livre circulante (DNAIc) é libertado para a corrente sanguínea (CS) na sequência do *turnover* celular e encontra-se presente em baixas concentrações (~ 1000 equivalentes de genoma/mL de plasma) na CS de indivíduos saudáveis. Contrariamente, em indivíduos com cancro este DNAIc encontra-se presente em níveis elevados devido à presença de DNA tumoral circulante (DNAtc), estando isso associado a tumores com perfil molecular mais agressivo e com maior atividade metabólica. Apesar da sua utilidade, a concentração total de DNAtc sozinha pode não permitir discriminar de forma confiável indivíduos saudáveis de doentes (200).

Por ter um tempo de meia vida curto na CS, o DNAtc é um biomarcador não invasivo ideal para monitorizar processos dinâmicos, como é o caso do CM, tendo potencial para vir a ser usado em biópsias líquidas (colheita de amostras de sangue ou outro fluido biológico para deteção de biomarcadores de rastreio, diagnóstico, prognóstico e/ou resposta à terapêutica) (200;201).

Os padrões de metilação do DNA celular estão conservados nas moléculas de DNAtc. Desta forma, a análise do padrão de metilação do DNAtc pode revelar qual o seu tecido de origem, servindo, assim, como um potencial biomarcador de patologias envolvendo morte celular, como é o caso do CM, em que o DNAtc específico de células mamárias pode funcionar como um marcador universal para a deteção e monitorização da doença (200).

Durante regimes de quimioterapia neoadjuvante, os níveis de DNAtc diminuem drasticamente, refletindo a resposta ao tratamento, pelo que a presença do mesmo aquando do fim do regime de quimioterapia reflete a existência de doença residual e serve ainda para a deteção de recidivas (200).

## 7.2. Células tumorais circulantes e células tumorais disseminadas

As células tumorais localizadas secretam fatores (ex. metaloproteases da matriz) que hidrolisam a matriz extracelular (MEC), alterando as adesões célula-célula. Na sequência deste processo, as células tumorais tornam-se cada vez mais móveis e com maior poder invasivo, destacando-se do tumor primário e sendo libertadas para o ambiente microvascular. Mesmo células que, usualmente, requerem ancoragem à MEC para sobreviver, adquirem alterações genotípicas (sobretudo nos genes relacionados com a apoptose) e fenotípicas que lhes permitem sobreviver de uma forma independente de ancoragem. Estas células não ancoradas tomam a designação de células tumorais circulantes (CTCs) e estão associadas à disseminação da doença (metastização), tendo sido estabelecida uma relação entre os níveis de CTCs e a progressão da doença (202;203).

A existência de CTCs foi reportada pela primeira vez em 1869 pelo físico australiano Thomas Ashworth, mas só em meados dos anos 90 é que foi reconhecida a sua utilidade clínica. A caracterização destas células a partir de uma simples amostra de sangue poderá servir como uma ferramenta valiosa para uma biópsia tumoral em tempo real, permitindo obter conhecimentos sobre a biologia do tumor sem a necessidade de testes invasivos (204).

A diminuição dos níveis de CTCs após um regime de quimioterapia adjuvante funciona como uma medida de resposta à terapêutica, podendo ter valor prognóstico quanto à probabilidade de haver uma recidiva da doença. Estas células podem ser detetadas por imunohistoquímica usando as citoqueratinas como marcadores antigénicos, uma vez que estas proteínas são expressas em todas as células epiteliais e, geralmente, estão ausentes nas células hematopoiéticas (205-207).

A medula óssea (MO) funciona como reservatório comum de CTCs de diversos tipos de carcinomas que, quando se alojam aqui, tomam a designação de células tumorais disseminadas (CTDs). A partir deste reservatório, estas células podem recircular para órgãos distantes onde encontrem melhores condições (metastização) (207-209).

As CTDs encontram-se num estado não proliferativo, pelo que poderão não responder à quimioterapia e a sua persistência após um regime de quimioterapia neoadjuvante é independente da resposta do tumor primário ao tratamento, estando associado a um pior prognóstico, já que indica a persistência de células com capacidade de metastizar (210-212).

Para além disto, as CTDs, nos pacientes com CM, frequentemente, apresentam um marcador fenotípico de células estaminais ( $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ ) o que vem reforçar a hipótese de que estas possam funcionar como células estaminais cancerígenas no processo de metastização do tumor (213;214).

A principal vantagem de detetar CTCs em detrimento de CTDs é que as primeiras podem ser detetadas por uma metodologia não invasiva, enquanto que as segundas requerem a realização de punções medulares. Contudo, ambas providenciam dados clínicos valiosos que podem ser indicativos de diferentes aspetos da doença, bem como geram informação prognóstica útil no contexto clínico (212;215;216).

## **8. Medicina de precisão**

A MP, muitas vezes usada como sinónimo de medicina personalizada, objetiva um sistema de saúde “talhado à medida”, em que, da junção das características clínico-patológicas com a genética e os biomarcadores do indivíduo, se geram diagnósticos, prognósticos e estratégias terapêuticas que são concebidos em função da singularidade de cada pessoa (a sua constituição genética, o seu estilo de vida e o ambiente que a envolve). Assim, a MP rejeita a abordagem “*one size fits all*” da medicina convencional, reconhecendo que cada indivíduo é único, bem como a sua doença, promovendo, desta forma, uma maior interdependência entre os diagnósticos e as terapêuticas que se pretendem direcionadas a cada caso, garantindo que cada fármaco é administrado ao indivíduo mais propenso a beneficiar dele e na dose mais adequada (5;217;218).

### **8.1. Medicina de precisão e radiosensibilidade**

A radioterapia é uma forma de tratamento local e regional que pode ser aplicada como uma alternativa à cirurgia ou em combinação com a cirurgia e a farmacoterapia para aumentar o controlo local da doença, bem como conservar a função dos órgãos, sendo parte integrante dos tratamentos *standard* no CM (219). Contudo, dados os seus efeitos secundários, é importante perceber quais são os indivíduos que têm maior probabilidade de beneficiar da mesma. Assim, a utilização de uma ferramenta preditiva da sensibilidade à radioterapia poderá melhorar a seleção de pacientes para os protocolos de radioterapia, bem como, potencialmente, diminuir os efeitos secundários relacionados com a mesma (220). Tal revela-se de extrema importância já que estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado diferenças significativas na sensibilidade à radioterapia entre diferentes tipos de tumores e entre pacientes com o mesmo tipo de tumor (221).

Torres-Roca e colaboradores (2005) desenvolveram o primeiro classificador de sensibilidade à radiação biologicamente validado. Na sua abordagem, selecionaram 3 genes conhecidos (isomerase A ribose 5-fosfato; proteína 4 de ligação ao retinoblastoma – RbAp48; regulador de sinalização da proteína G) e um gene desconhecido (*zinc finger protein encoding*



gene) como preditivos da sensibilidade à radiação. As observações que validaram a sua abordagem foram a identificação da proteína RbAp48 como estando envolvida na resposta à radiação. Quando sobreexpressa, esta proteína foi associada a radiosensibilidade o que poderá dever-se a uma ação reguladora negativa sobre a Ras que se pensa ser um mediador central na resistência à radiação através da via Akt, bem como à influência na montagem e remodelação da cromatina, já que a RbAp48 influencia praticamente todos as fases do metabolismo da cromatina.

Um modelo de radiosensibilidade baseado em biologia de sistemas e validado em dados clínicos independentes surge pelo trabalho de Eschrich e dos seus colaboradores (2009), que desenvolveram um índice de radiosensibilidade (IR) (assinatura molecular de radiosensibilidade) que visa funcionar como um biomarcador de radiosensibilidade celular. Este índice é obtido com base na análise da expressão de 10 genes específicos e um algoritmo de regressão linear, gerando um *score* que é diretamente proporcional à radiorresistência tumoral, desempenhando, por isso, um papel importante na individualização da terapêutica.

A fração de sobrevivência a 2 Gy (SF2), uma medida de radiosensibilidade celular, foi o principal critério usado para identificar os 10 genes na assinatura molecular (AR, c-Jun, STAT1, PKC, RelA (p65), cABL, SUMO-1, CDK1 (p34), HDAC1, and IRF1). As principais vias de sinalização representadas nesta assinatura incluem: resposta a danos no DNA, desacetilação das histonas, regulação do ciclo celular, apoptose e proliferação, todas elas importantes na resposta à radiação (222).

O IR representa a assinatura molecular mais extensamente validada na área da radiação oncológica. A sua análise é extremamente importante já que, sem ele, aproximadamente 60% dos pacientes com cancro vão receber radioterapia a certo ponto do tratamento, sem ter em consideração as potenciais diferenças individuais na radiosensibilidade tumoral (222;223).

## **8.2. Rastreio baseado no risco na era da medicina de precisão**

O principal objetivo das estratégias de rastreio é uma deteção precoce, por forma a reduzir a mortalidade do CM. Contudo, a deteção precoce pelo rastreio em massa, apesar de ter o potencial de reduzir a mortalidade, pode também conduzir a sobrediagnósticos e, conseqüentemente, levar a tratamento excessivo (224).

O elevado uso de rastreio por mamografia que se observou no passado levou à deteção de um grande número de casos de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), a maioria dos quais não clinicamente relevantes, embora praticamente todos tratados cirurgicamente pela ausência de informação prognóstica. Tal faz com que o rastreio por mamografia possa beneficiar algumas mulheres pela deteção precoce de tumores potencialmente fatais, mas também prejudicar

outras pela detecção de lesões de DCIS clinicamente insignificantes (225). Contudo, os resultados são um pouco contraditórios já que outros autores defendem que, embora tenham ocorrido aumentos relativos nos diagnósticos de DCIS, os rácios absolutos de detecção permaneceram baixos (226).

Numa abordagem “*one size fits all*”, as recomendações europeias do grupo EUSOBI, relativamente ao rastreio por mamografia, preconizam um intervalo de 2 anos para a população feminina geral entre os 50 e os 70 anos, contatando-se que, dependendo do programa nacional/regional de rastreio, a mamografia se realiza todos os 1, 2 ou 3 anos, desde os 40 – 50 anos até os 70 – 75 anos, aproximadamente. Nos Estados Unidos, a idade recomendada para iniciar estas avaliações, bem como o intervalo entre elas, também não é consensual entre as diferentes organizações. Existe, assim, uma grande diversidade de opiniões quanto à idade a que iniciar a mamografia, bem como aos intervalos entre cada análise, entre os sistemas de saúde de diferentes países (227-229).

De acordo com alguns autores, em pessoas de risco moderado, a realização de rastreios de 2 em 2 anos, a mulheres com idades entre 50 e os 70 anos, traz mais benefícios que estratégias anuais ou estratégias que comecem aos 40 anos, já que consegue reduzir a mortalidade por CM na mesma proporção, com menos efeitos deletérios, menos falsos positivos e com menos custos associados (230-232).

Já que nem todas as mulheres têm o mesmo risco de desenvolver CM, nem o mesmo tipo de CM, para maximizar os benefícios e minimizar os malefícios das técnicas de rastreio, é necessário que passemos de abordagens “*one size fits all*”, padronizadas para a população em geral, para abordagens mais personalizadas, baseadas no risco individual. A idade, por si só, revela-se um marcador de risco imperfeito pelo que recomendações personalizadas deverão ter em consideração, para além da idade da mulher, outros fatores de risco como a densidade mamária, história pessoal CM, história familiar de CM, fatores de risco genético, bem como crenças quanto aos potenciais benefícios e malefícios do rastreio, constatando-se que estabelecer a frequência de rastreio com base em fatores de risco individuais poderá ser mais custo-efetivo (233-235).

WISDOM (NCT02620852) é um ensaio clínico, com início em 2015, que visa comparar uma estratégia de rastreio baseada na idade com um planeamento baseado no risco individual de cada mulher desenvolver CM (236). Os resultados deste ensaio serão fundamentais para que se possa alterar o atual paradigma das estratégias de rastreio e possa ocorrer uma difusão da implementação de estratégias de rastreio baseadas no risco individual, um dos postulados da MP.

### 8.3. O papel das técnicas de análise de imagem na medicina de precisão

Existem várias técnicas de análise de imagem, sendo as mais conhecidas as seguintes: mamografia, ressonância magnética (RM), tomografia por emissão de positrões (TEP), espectroscopia de difusão ótica (EDO) e ultrassonografia.

A mamografia é uma técnica radiográfica que recorre a baixas doses de raios-X e que pode ser usada para rastreio ou para diagnóstico. Existem 2 tipos de mamografia: a mamografia digital de campo inteiro e a tomossíntese digital ao peito. Enquanto que a 1ª é em 2D, gerando uma única imagem em que tecidos sobrepostos podem simular ou ocultar lesões, a 2ª é em 3D permitindo uma reconstrução volumétrica do peito, em que se podem observar as várias camadas de tecido, permitindo, assim, aumentar a taxa de deteção de CM e diminuir a taxa de falsos positivos, pelo que poderá constituir o método mamográfico usado para rastreio no futuro (237).

No que respeita ao CM, o rastreio por mamografia é considerado a 1ª linha, recorrendo-se a RM em mulheres de elevado risco (238;239).

No contexto da MP, com a ressonância magnética é ainda possível fazer uma fenotipagem dos tumores baseada em imagens e, com isso, discriminar entre subtipos moleculares de CM (associação entre as características genómicas e os fenótipos de imagem), aceder ao risco de recidiva, avaliar a heterogeneidade intratumoral e resposta à terapêutica, bem como prever qual o grau do tumor e o envolvimento nodal (240-245).

Na TEP, o uso de radionuclídeos constitui uma forma não invasiva de monitorizar a expressão do RE e RP e, dessa forma, a resposta à terapêutica endócrina (246;247); monitorizar a atividade metabólica do tumor, o que constitui uma forma indireta de monitorizar a resposta à quimioterapia neoadjuvante (248;249); monitorizar a expressão do recetor HER-2 e, assim, a resposta à terapêutica direcionada (250); bem como quantificar a perfusão tumoral com o objetivo de monitorizar a eficácia do tratamento com agentes anti-angiogénicos (251).

Com a EDO é possível prever e monitorizar a resposta do tumor à quimioterapia neoadjuvante através da observação de alterações na composição bioquímica do tumor (concentração oxihemoglobina, desoxihemoglobina, água e lípidos) decorrentes da administração da quimioterapia (252;253).

Com a ultrassonografia é possível analisar a rigidez do tumor e usá-la como medida para avaliar a resposta à quimioterapia neoadjuvante, bem como diferenciar entre lesões benignas e malignas; medir a vascularização do tumor após quimioterapia neoadjuvante; e avaliar a morte das células tumorais decorrente da administração de quimioterapia (254-256).

Das informações supramencionadas é perceptível que as técnicas de análise de imagem constituem ferramentas não invasivas e prontamente disponíveis para rastreio, diagnóstico e monitorização da doença cuja utilização permite monitorizar precocemente a resposta à terapêutica, otimizando a dose de fármaco de forma dinâmica e, assim, transitar de uma abordagem “*one size fits all*” para uma abordagem mais personalizada. Os resultados do ensaio clínico I-SPY 2 (NCT01042379), um ensaio que visa avaliar os agentes terapêuticos mais efetivos em cada tipo de CM, bem como aceder a indicadores de resposta precoce (análise do tumor antes da cirurgia através de imagens de RM) como ferramenta preditiva da eficácia terapêutica, poderão vir a reforçar o papel que as técnicas de análise de imagem podem vir a desempenhar no contexto da MP no CM (257).

## **9. Atuais limitações da medicina de precisão**

Tal como mencionado ao longo do trabalho, a MP representa uma abordagem clínica promissora na individualização do tratamento. Contudo, a implementação desta abordagem terapêutica enfrenta alguns desafios, nomeadamente no que respeita às análises genómicas, devido não só ao grande volume de dados gerados (“*big data*”) como também à dificuldade na interpretação dos mesmos, já que existe ainda um conhecimento incompleto do papel fisiopatológico que cada gene e cada variante podem exercer, bem como quais os efeitos resultantes das interações entre todos esses genes e respetivas variantes. Tudo isto leva à necessidade de criar uma poderosa arquitetura computacional capaz de armazenar e gerir a informação recolhida, bem como criar um painel de especialistas capaz de interpretar a informação gerada (258).

As análises genómicas levantam ainda problemas de índole ética, sendo importante definir quem poderá ter acesso aos dados, qual o uso futuro das amostras e dados recolhidos, bem como quais os resultados que deverão ser comunicados ao doente e as potenciais consequências que os mesmo poderão repercutir no doente e nos seus familiares (259).

No que respeita às biópsias líquidas, embora estas tenham um grande potencial, para que possa haver a sua implementação na prática clínica é necessário garantir reprodutibilidade e padronização das técnicas de colheita e análise, custo-efetividade, bem como proceder à sua validação prospetiva em ensaios clínicos (201).

Outros entraves à implementação da MP são os custos associados e a relutância dos médicos em alterar as práticas clínicas *standard*, já que são confrontados com uma grande quantidade de testes, muitos dos quais não estão ainda clinicamente validados ou disponíveis em todos os países, o que limita o acesso às plataformas analíticas (91;260;261).

## 10. Conclusão e perspectivas futuras

O CM pode ser definido como um conjunto de doenças de origem multifatorial que afeta mulheres em todo o mundo e cuja incidência tem tendência para aumentar. Apesar deste aumento de incidência, observa-se uma redução na mortalidade do CM, em virtude das melhorias no tratamento e no diagnóstico precoce.

A MP é uma abordagem atual, com enorme potencial clínico e ainda muito por explorar. Com os avanços no conhecimento genómico espera-se conseguir identificar melhor as alterações genéticas e moleculares que poderão ter relevância clínica e, desse modo, identificar novos alvos terapêuticos para os quais se poderão desenvolver terapêuticas direcionadas, por forma a alcançar o melhor resultado clínico possível.

Incorporar a genómica e outras análises moleculares na rotina da prática clínica necessitará de uma mudança de mentalidade e de uma forte colaboração interdisciplinar, em virtude da multiplicidade de especialistas necessários para integrar adequadamente a MP na clínica.

O ensaio clínico TAPUR (NCT02693535) é um estudo em curso com processo de recrutamento ativo que visa avaliar a prática clínica real de prescrição de terapêuticas direcionadas em tumores avançados com variações genómicas conhecidas como sendo alvos farmacológicos relevantes, bem como predizer a sensibilidade aos fármacos (262). O IMPACT II (NCT02152254) é um ensaio clínico que também se encontra em processo de recrutamento e que visa avaliar os benefícios de um tratamento que tem em consideração os perfis moleculares e terapêutica direcionada em doentes com cancro metastático, comparativamente aos tratamentos *standard* (263). Os resultados destes ensaios clínicos, bem como de outros que se venham a iniciar, serão fundamentais para que a MP seja robustamente validada e, assim, quando disponível, passe a ter maior aplicação clínica.

Com a evolução do conhecimento científico e tecnológico, as intervenções terapêuticas direcionadas tornar-se-ão cada vez mais disponíveis e, apesar de mais onerosas que os tratamentos *standard*, revelar-se-ão mais custo-efetivas, uma vez que serão administradas apenas aos indivíduos com maior probabilidade de beneficiar delas, garantindo, desse modo, uma otimização dos recursos de saúde.

## Referências Bibliográficas

- (3) VISVADER, JANE E. - **Cells of origin in cancer.** Nature. 469:7330 (2011) 314-322. doi: 10.1038/nature09781.
- (4) GHONCHEH, MAHSHID; POURNAMDAR, ZAHRA; SALEHINIYA, HAMID - **Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 17:3 (2016) 43-46. doi: 10.7314/apjcp.2016.17.s3.43.
- (6) BECKMANN, M. W. *et al.* - **Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity.** Journal of Molecular Medicine. 75:6 (1997) 429-439. doi: 10.1007/s001090050128.
- (7) PORTELA, ANNA; ESTELLER, MANEL - **Epigenetic modifications and human disease.** Nature Biotechnology. 28:10 (2010) 1057-1068. doi: 10.1038/nbt.1685.
- (8) JAIN, PAWAN K. - **Epigenetics: The Role of Methylation in the Mechanism of Action of Tumor Suppressor Genes.** Annals of the New York Academy of Sciences. 983:1 (2003) 71-83. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb05963.x.
- (9) GOOD, CHARLY RYAN *et al.* - **TET1-Mediated Hypomethylation Activates Oncogenic Signaling in Triple-Negative Breast Cancer.** Cancer Research. 78:15 (2018) 4126-4137. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-2082.
- (10) FERLAY, J. *et al.* - **Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.** International Journal of Cancer. 144:8 (2018) 1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937.
- (11) LIU, NING; JOHNSON, KIMBERLY J.; MA, CYNTHIA X. - **Male Breast Cancer: An Updated Surveillance, Epidemiology, and End Results Data Analysis.** Clinical Breast Cancer. 18:5 (2018) e997-e1002. doi: 10.1016/j.clbc.2018.06.013
- (12) SIEGEL, REBECCA L.; MILLER, KIMBERLY D.; JEMAL, AHMEDIN - **Cancer statistics, 2020.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. 70:1 (2020) 7-30. doi: 10.3322/caac.21590.
- (13) BRAY, FREDDIE *et al.* - **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68:6 (2018) 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

- (15) VOGEL, VICTOR G. - **Epidemiology of Breast Cancer.** *The Breast.* 4 (2018) 207-218. doi: 10.1016/b978-0-323-35955-9.00015-5.
- (16) ELSHEIKH, SOMAIA E. *et al.* - **Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate with Tumor Phenotypes, Prognostic Factors, and Patient Outcome.** *Cancer Research.* 69:9 (2009) 3802-3809. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-3907.
- (17) MARUSYK, ANDRIY; POLYAK, KORNELIA - **Tumor heterogeneity: Causes and consequences.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1805:1 (2010) 105-117. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
- (18) MEACHAM, CORBIN E.; MORRISON, SEAN J. - **Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity.** *Nature.* 501:7467 (2013) 328-337. doi: 10.1038/nature12624.
- (19) DIAS, ANA S. *et al.* - **Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment.** *European Journal of Cancer.* 121 (2019) 154-171. doi: 10.1016/j.ejca.2019.09.002.
- (20) PLACE, ANDREW E; JIN HUH, SUNG; POLYAK, KORNELIA - **The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment.** *Breast Cancer Research.* 13:6 (2011). doi: 10.1186/bcr2912.
- (21) REYA, TANNISHTHA *et al.* - **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature.* 414:6859 (2001) 105-111. doi: 10.1038/35102167.
- (22) AL-HAJJ, MUHAMMAD; CLARKE, MICHAEL F. - **Self-renewal and solid tumor stem cells.** *Oncogene.* 23:43 (2004) 7274-7282. doi: 10.1038/sj.onc.1207947.
- (23) NOWELL, P. - **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science.* 194:4260 (1976) 23-28. doi: 10.1126/science.959840.
- (24) GERLINGER, MARCO *et al.* - **Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing.** *New England Journal of Medicine.* 366:10 (2012) 883-892. doi: 10.1056/nejmoa1113205.
- (26) PIKE, M. C. *et al.* - **'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer.** *Nature.* 303:5920 (1983) 767-770. doi: 10.1038/303767a0.

- (27) HARRIS, JAY R. *et al.* - **Breast Cancer**. *New England Journal of Medicine*. 327:5 (1992) 319-328. doi: 10.1056/nejm199207303270505.
- (28) ANDERS, CAREY K. *et al.* - **Breast Cancer Before Age 40 Years**. *Seminars in Oncology*. 36:3 (2009) 237-249. doi: 10.1053/j.seminoncol.2009.03.001.
- (29) SAKORAFAS, GEORGE H.; KRESPIS, EUSTATHIOS; PAVLAKIS, GEORGE - **Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective**. *Surgical Oncology*. 10:4 (2002) 183-192. doi: 10.1016/s0960-7404(02)00016-6.
- (30) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer - **Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies** - *The Lancet Oncology*. 13:11 (2012) 1141-1151. doi: 10.1016/s1470-2045(12)70425-4.
- (31) KELSEY, JENNIFER L.; GAMMON, MARILIE D.; JOHN, ESTHER M. - **Reproductive Factors and Breast Cancer**. *Epidemiologic Reviews*. 15:1 (1993) 36-47. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115.
- (32) ALBREKTSEN, G. *et al.* - **Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects**. *British Journal of Cancer*. 92:1 (2004) 167-175. doi: 10.1038/sj.bjc.6602302.
- (33) MERRILL, RAY M. *et al.* - **Cancer risk associated with early and late maternal age at first birth**. *Gynecologic Oncology*. 96:3 (2005) 583-593. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.11.038.
- (34) RUSSO, JOSE *et al.* - **Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women**. *International Journal of Cancer*. 131:5 (2012) 1059-1070. doi: 10.1002/ijc.27323.
- (35) DOS SANTOS, CAMILA O. *et al.* - **An Epigenetic Memory of Pregnancy in the Mouse Mammary Gland**. *Cell Reports*. 11:7 (2015) 1102-1109. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.015.
- (36) HUSBY, ANDERS *et al.* - **Pregnancy duration and breast cancer risk**. *Nature Communications*. 9:1 (2018). doi: 10.1038/s41467-018-06748-3.



- (37) MIKI, Y. *et al.* - **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** *Science*. 266:5182 (1994) 66-71. doi: 10.1126/science.7545954.
- (38) SHIOVITZ, S.; KORDE, L.A. - **Genetics of breast cancer: a topic in evolution.** *Annals of Oncology*. 26:7 (2015) 1291-1299. doi: 10.1093/annonc/mdv022.
- (39) KUHL, CHRISTIANE K. *et al.* - **Mammography, Breast Ultrasound, and Magnetic Resonance Imaging for Surveillance of Women at High Familial Risk for Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology*. 23:33 (2005) 8469-8476. doi: 10.1200/jco.2004.00.4960.
- (41) BREWER, HANNAH R. *et al.* - **Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure.** *Breast Cancer Research and Treatment*. 165:1 (2017) 193-200. doi: 10.1007/s10549-017-4325-2.
- (42) HANCOCK, S. L.; TUCKER, M. A.; HOPPE, R. T. - **Breast Cancer After Treatment of Hodgkin's Disease.** *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 85:1 (1993) 25-31. doi: 10.1093/jnci/85.1.25.
- (43) AISENBERG, ALAN C. *et al.* - **High risk of breast carcinoma after irradiation of young women with Hodgkin's disease.** *Cancer*. 79:6 (1997) 1203-1210. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19970315)79:6<1203::aid-cnrcr20>3.0.co;2-2.
- (44) JOHN, ESTHER M. *et al.* - **Medical radiation exposure and breast cancer risk: Findings from the Breast Cancer Family Registry.** *International Journal of Cancer*. 121:2 (2007) 386-394. doi: 10.1002/ijc.22668.
- (45) DE BRUIN, MARIE L. *et al.* - **Breast Cancer Risk in Female Survivors of Hodgkin's Lymphoma: Lower Risk After Smaller Radiation Volumes.** *Journal of Clinical Oncology*. 27:26 (2009) 4239-4246. doi: 10.1200/jco.2008.19.9174.
- (46) TOKUNAGA, MASAYOSHI *et al.* - **Incidence of Female Breast Cancer among Atomic Bomb Survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980.** *Radiation Research*. 112:2 (1987) 243. doi: 10.2307/3577254.
- (47) GOODMAN, MARC T. *et al.* - **Risk Factors for Primary Breast Cancer in Japan: 8-Year Follow-Up of Atomic Bomb Survivors.** *Preventive Medicine*. 26:1 (1997) 144-153. doi: 10.1006/pmed.1996.9979.

- (48) KHAN, NAGHMA; AFAQ, FARRUKH; MUKHTAR, HASAN - **Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies.** *Cancer Letters*. 293:2 (2010) 133-143. doi: 10.1016/j.canlet.2009.12.013.
- (49) LAUDISIO, DANIELA *et al.* - **Breast cancer prevention in premenopausal women: role of the Mediterranean diet and its components.** *Nutrition Research Reviews*. (2019) 1-14. doi: 10.1017/s0954422419000167.
- (50) PAN, KATHY *et al.* - **Weight loss, diet composition and breast cancer incidence and outcome in postmenopausal women.** *Oncotarget*. 10:33 (2019). doi: 10.18632/oncotarget.26864.
- (51) PRENTICE, ROSS L. *et al.* - **Low-Fat Dietary Pattern among Postmenopausal Women Influences Long-Term Cancer, Cardiovascular Disease, and Diabetes Outcomes.** *The Journal of Nutrition*. 149:9 (2019) 1565-1574. doi: 10.1093/jn/nxz107.
- (52) STEPHENSON, GINA DAY; ROSE, DAVID P. - **Breast Cancer and Obesity: An Update.** *Nutrition and Cancer*. 45:1 (2003) 1-16. doi: 10.1207/S15327914NC4501\_1.
- (53) ROSE, DAVID P.; VONA-DAVIS, LINDA - **Interaction between menopausal status and obesity in affecting breast cancer risk.** *Maturitas*. 66:1 (2010) 33-38. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.01.019.
- (54) KERSHAW, ERIN E.; FLIER, JEFFREY S. - **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89:6 (2004) 2548-2556. doi: 10.1210/jc.2004-0395.
- (55) IYENGAR, NEIL M.; HUDIS, CLIFFORD A.; DANNENBERG, ANDREW J. - **Obesity and Inflammation: New Insights into Breast Cancer Development and Progression.** *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 33 (2013) 46-51. doi: 10.14694/edbook\_am.2013.33.46.
- (56) MANAVATHI, BRAMANANDAM *et al.* - **Derailed Estrogen Signaling and Breast Cancer: An Authentic Couple.** *Endocrine Reviews*. 34:1 (2013) 1-32. doi: 10.1210/er.2011-1057.

- (57) CLEARY, MARGOT P.; GROSSMANN, MICHAEL E. - **Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection.** *Endocrinology*. 150:6 (2009) 2537-2542. doi: 10.1210/en.2009-0070.
- (58) PFEILER, GEORG *et al.* - **Correlation of body mass index and menopausal status with the intra-tumoral estrogen system in invasive breast cancer.** *Gynecological Endocrinology*. 25:3 (2009) 183-187. doi: 10.1080/09513590802549825.
- (59) NEILSON, HEATHER K.; CONROY, SHANNON M.; FRIEDENREICH, CHRISTINE M. - **The Influence of Energetic Factors on Biomarkers of Postmenopausal Breast Cancer Risk.** *Current Nutrition Reports*. 3:1 (2013) 22-34. doi: 10.1007/s13668-013-0069-8.
- (60) SANTA-MARIA, CESAR AUGUSTO *et al.* - **Aggressive estrogen-receptor-positive breast cancer arising in patients with elevated body mass index.** *International Journal of Clinical Oncology*. 20:2 (2014) 317-323. doi: 10.1007/s10147-014-0712-4.
- (61) CHEN, WENDY Y. *et al.* - **Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk.** *JAMA*. 306:17 (2011) 1884. doi: 10.1001/jama.2011.1590.
- (62) EKWUEME, DONATUS U. *et al.* - **Estimation of Breast Cancer Incident Cases and Medical Care Costs Attributable to Alcohol Consumption Among Insured Women Aged <45 Years in the U.S.** *American Journal of Preventive Medicine*. 53:3 (2017) 47-54. doi: 10.1016/j.amepre.2017.05.023.
- (63) CAO, YIN *et al.* - **Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies.** *BMJ*. 351 (2015) 4238. doi: 10.1136/bmj.h4238.
- (64) BAGNARDI, V. *et al.* - **Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis.** *British Journal of Cancer*. 112:3 (2014) 580-593. doi: 10.1038/bjc.2014.579.
- (65) ENGER, S. M. *et al.* - **Alcohol consumption and breast cancer oestrogen and progesterone receptor status.** *British Journal of Cancer*. 79:7-8 (1999) 1308-1314. doi: 10.1038/sj.bjc.6690210.

- (66) ENGER, S. M. *et al.* - **Alcohol consumption and breast cancer oestrogen and progesterone receptor status.** British Journal of Cancer. 79:7-8 (1999) 1308-1314. doi: 10.1038/sj.bjc.6690210.
- (67) SINGLETARY, KEITH W; FREY, RANDALL S; YAN, WEN - **Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor- $\alpha$  expression in human breast cancer cells.** Cancer Letters. 165:2 (2001) 131-137. doi: 10.1016/s0304-3835(01)00419-0.
- (68) MARCHBANKS, POLLY A. *et al.* - **Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer.** New England Journal of Medicine. 346:26 (2002) 2025-2032. doi: 10.1056/nejmoa013202.
- (69) MARCHBANKS, POLLY A. *et al.* - **Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer.** Contraception. 85:4 (2012) 342-350. doi: 10.1016/j.contraception.2011.08.007.
- (70) MØRCH, LINA S. *et al.* - **Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer.** New England Journal of Medicine. 377:23 (2017) 2228-2239. doi: 10.1056/nejmoa1700732.
- (71) IVERSEN, LISA *et al.* - **Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study.** American Journal of Obstetrics and Gynecology. 216:6 (2017) 580.e1-580.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2017.02.002.
- (72) GRAAFLAND, LAURA; ABBOTT, MAURA; ACCORDINO, MELISSA - **Breast Cancer Risk Related to Combined Oral Contraceptive Use.** The Journal for Nurse Practitioners. 16:2 (2020) 116-120. doi: 10.1016/j.nurpra.2019.11.018.
- (73) GREENDALE, GAIL A; LEE, NANCY P; ARRIOLA, EDGA R. - **The menopause.** The Lancet. 353:9152 (1999) 571-580. doi: 10.1016/s0140-6736(98)05352-5.
- (74) MARSDEN, JO - **The menopause, hormone replacement therapy and breast cancer.** The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 83:1-5 (2002) 123-132. doi: 10.1016/s0960-0760(02)00258-3.
- (75) CHERVENAK, JUDI - **Bioidentical hormones for maturing women.** Maturitas. 64:2 (2009) 86-89. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.08.002.

- (76) COLDITZ, GRAHAM A. *et al.* - **The Use of Estrogens and Progestins and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women.** *New England Journal of Medicine.* 332:24 (1995) 1589-1593. doi: 10.1056/nejm199506153322401.
- (77) FOLSOM, A. R. *et al.* - **Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women.** *American Journal of Public Health.* 85:8 (1995) 1128-1132. doi: 10.2105/ajph.85.8\_pt\_1.1128.
- (78) GRODSTEIN, FRANCINE *et al.* - **Postmenopausal Hormone Therapy and Mortality.** *New England Journal of Medicine.* 336:25 (1997) 1769-1776. doi: 10.1056/nejm199706193362501.
- (79) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer - **Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer.** *The Lancet.* 350:9084 (1997) 1047-1059. doi: 10.1016/s0140-6736(97)08233-0.
- (80) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer - **Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence.** *The Lancet.* 394:10204 (2019) 1159-1168. doi: 10.1016/s0140-6736(19)31709-x.
- (81) COL, NANANDA F. - **Patient-Specific Decisions About Hormone Replacement Therapy in Postmenopausal Women.** *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 277:14 (1997) 1140. doi: 10.1001/jama.1997.03540380054031.
- (82) EROLES, PILAR *et al.* - **Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer Treatment Reviews.* 38:6 (2012) 698-707. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005.
- (83) PRAT, ALEIX *et al.* - **Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer.** *The Breast.* 24:2 (2015) 26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008.
- (84) GAO, JENNIFER J.; SWAIN, SANDRA M. - **Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review.** *The Oncologist.* 23:5 (2018) 556-565. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0535.

- (85) PEROU, CHARLES M. *et al.* - **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature.* 406:6797 (2000) 747-752. doi: 10.1038/35021093.
- (86) KOBOLDT, D. *et al.* - **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature.* 490:7418 (2012) 61-70. doi: 10.1038/nature11412.
- (87) TOSS, ANGELA; CRISTOFANILLI, MASSIMO - **Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer.** *Breast Cancer Research.* 17:1 (2015). doi: 10.1186/s13058-015-0560-9.
- (88) CHEANG, MAGGIE C. U. *et al.* - **Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer.** *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 101:10 (2009) 736-750. doi: 10.1093/jnci/djp082.
- (89) PRAT, ALEIX *et al.* - **Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 31:2 (2013) 203-209. doi: 10.1200/jco.2012.43.4134.
- (90) ADES, FELIPE *et al.* - **Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives.** *Journal of Clinical Oncology.* 32:25 (2014) 2794-2803. doi: 10.1200/jco.2013.54.1870.
- (91) 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.** *Annals of Oncology.* 24:9 (2013) 2206-2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
- (92) LOI, SHERENE *et al.* - **Definition of Clinically Distinct Molecular Subtypes in Estrogen Receptor–Positive Breast Carcinomas Through Genomic Grade.** *Journal of Clinical Oncology.* 25:10 (2007) 1239-1246. doi: 10.1200/jco.2006.07.1522.
- (93) TRAN, BEN; BEDARD, PHILIPPE L. - **Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets.** *Breast Cancer Research.* 13:6 (2011). doi: 10.1186/bcr2904.
- (94) ECCLES, SUZANNE A. - **The Role of c-erbB-2/HER2/neu in Breast Cancer Progression and Metastasis.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 6:4 (2001) 393-406. doi: 10.1023/a:1014730829872.

- (95) HYNES, NANCY E.; LANE, HEIDI A. - **ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.** *Nature Reviews Cancer*. 5:5 (2005) 341-354. doi: 10.1038/nrc1609.
- (96) LV, QUANXIA *et al.* - **Molecular Mechanisms and Translational Therapies for Human Epidermal Receptor 2 Positive Breast Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*. 17:12 (2016) 2095. doi: 10.3390/ijms17122095.
- (97) LAVAUD, PERNELLE; ANDRE, FABRICE - **Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials.** *BMC Medicine*. 12:1 (2014). doi: 10.1186/s12916-014-0132-3.
- (98) FERRARI, ANTHONY *et al.* - **A whole-genome sequence and transcriptome perspective on HER2-positive breast cancers.** *Nature Communications*. 7:1 (2016). doi: 10.1038/ncomms12222.
- (99) PARKER, JOEL S. *et al.* - **Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes.** *Journal of Clinical Oncology*. 27:8 (2009) 1160-1167. doi: 10.1200/jco.2008.18.1370.
- (100) STAAF, JOHAN *et al.* - **High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer.** *Breast Cancer Research*. 12:3 (2010). doi: 10.1186/bcr2568.
- (101) TZAHAR, E. - **The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1377:1 (1998) M25-M37. doi: 10.1016/s0304-419x(97)00032-2.
- (102) RUIZ-SAENZ, ANA *et al.* - **HER2 amplification in tumors activates PI3K/Akt signaling independent of HER3.** *Cancer Research*. 78:13 (2018) 3645–3658. doi: 10.1158/0008-5472.can-18-0430.
- (103) 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*. 100:18 (2003) 10393-10398. doi: 10.1073/pnas.1732912100.
- (104) FIGUEROA-MAGALHÃES, MARIA CRISTINA *et al.* - **Treatment of HER2-positive breast cancer.** *The Breast*. 23:2 (2014) 128-136. doi: 10.1016/j.breast.2013.11.011.

- (105) BADVE, SUNIL *et al.* - **Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists.** *Modern Pathology*. 24:2 (2010) 157-167. doi: 10.1038/modpathol.2010.200.
- (106) VALENTIN, MEV DOMINGUEZ *et al.* - **Molecular insights on basal-like breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment*. 134:1 (2012) 21-30. doi: 10.1007/s10549-011-1934-z.
- (107) PEROU, C. M. - **Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers.** *The Oncologist*. 16:S1 (2011) 61-70. doi: 10.1634/theoncologist.2011-s1-61.
- (108) COLLINS, LAURA C. *et al.* - **Basal Cytokeratin and Epidermal Growth Factor Receptor Expression Are Not Predictive of BRCA1 Mutation Status in Women With Triple-negative Breast Cancers.** *The American Journal of Surgical Pathology*. 33:7 (2009) 1093-1097. doi: 10.1097/pas.0b013e31819c1c93.
- (109) SOTIRIOU, CHRISTOS; PUSZTAI, LAJOS - **Gene-Expression Signatures in Breast Cancer.** *New England Journal of Medicine*. 360:8 (2009) 790-800. doi: 10.1056/nejmra0801289.
- (110) KHRAMTSOV, ANDREY I. *et al.* - **Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation Is Enriched in Basal-Like Breast Cancers and Predicts Poor Outcome.** *The American Journal of Pathology*. 176:6 (2010) 2911-2920. doi: 10.2353/ajpath.2010.091125.
- (111) CHIN, SUET F. *et al.* - **High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer.** *Genome Biology*. 8:10 (2007) 215. doi: 10.1186/gb-2007-8-10-r215.
- (112) KREIKE, BAS *et al.* - **Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas.** *Breast Cancer Research*. 9:5 (2007). doi: 10.1186/bcr1771.
- (113) KIM, MI-JUNG *et al.* - **Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes.** *Human Pathology*. 37:9 (2006) 1217-1226. doi: 10.1016/j.humpath.2006.04.015.



- (114) CHEANG, M. C.U. *et al.* - **Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype.** *Clinical Cancer Research.* 14:5 (2008) 1368-1376. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1658.
- (115) LEHMANN, BRIAN D. *et al.* - **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** *Journal of Clinical Investigation.* 121:7 (2011) 2750-2767. doi: 10.1172/jci45014.
- (116) PRAT, ALEIX *et al.* - **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Research.* 12:5 (2010). doi: 10.1186/bcr2635.
- (117) LEHMANN, BRIAN D.; PIETENPOL, JENNIFER A. - **Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes.** *The Journal of Pathology.* 232:2 (2013) 142-150. doi: 10.1002/path.4280.
- (118) ZURRIDA, STEFANO; VERONESI, UMBERTO - **Milestones in Breast Cancer Treatment.** *The Breast Journal.* 21:1 (2014) 3-12. doi: 10.1111/tbj.12361.
- (119) COLLINS, FRANCIS S.; VARMUS, HAROLD - **A New Initiative on Precision Medicine.** *New England Journal of Medicine.* 372:9 (2015) 793-795. doi: 10.1056/nejmp1500523.
- (120) LARRY JAMESON, J.; LONGO, DAN L. - **Precision Medicine—Personalized, Problematic, and Promising.** *Obstetrical & Gynecological Survey.* 70:10 (2015) 612-614. doi: 10.1097/01.ogx.0000472121.21647.38.
- (121) DUFFY, MICHAEL J. *et al.* - **Validated biomarkers: The key to precision treatment in patients with breast cancer.** *The Breast.* 29 (2016) 192-201. doi: 10.1016/j.breast.2016.07.009.
- (123) JOHNSTON, S.R.D. - **Targeting downstream effectors of epidermal growth factor receptor/HER2 in breast cancer with either farnesyltransferase inhibitors or mTOR antagonists.** *International Journal of Gynecological Cancer.* 16:2 (2006) 543-548. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00692.x.

- (124) SCHWARTZ, GARY K.; SHAH, MANISH A. - **Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy**. *Journal of Clinical Oncology*. 23:36 (2005) 9408-9421. doi: 10.1200/jco.2005.01.5594.
- (125) MUSGROVE, ELIZABETH A. *et al.* - **Cyclin D as a therapeutic target in cancer**. *Nature Reviews Cancer*. 11:8 (2011) 558-572. doi: 10.1038/nrc3090.
- (126) WITKIEWICZ, AGNIESZKA K; KNUDSEN, ERIK S. - **Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions**. *Breast Cancer Research*. 16:2 (2014). doi: 10.1186/bcr3652.
- (127) GOEL, SHOM *et al.* - **Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors**. *Cancer Cell*. 29:3 (2016) 255-269. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.006.
- (128) SCOTT, SUSAN COMBS; LEE, SARAH S.; ABRAHAM, JAME - **Mechanisms of therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer**. *Seminars in Oncology*. 44:6 (2017) 385-394. doi: 10.1053/j.seminoncol.2018.01.006.
- (129) FINN, RICHARD S. *et al.* - **Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer**. *New England Journal of Medicine*. 375:20 (2016) 1925-1936. doi: 10.1056/nejmoa1607303.
- (130) HORTOBAGYI, GABRIEL N. *et al.* - **Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer**. *New England Journal of Medicine*. 375:18 (2016) 1738-1748. doi: 10.1056/nejmoa1609709.
- (131) DICKLER, MAURA N. *et al.* - **MONARCH I, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer**. *Clinical Cancer Research*. 23:17 (2017) 5218-5224. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-17-0754.
- (132) GOETZ, MATTHEW P. *et al.* - **MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer**. *Journal of Clinical Oncology*. 35:32 (2017) 3638-3646. doi: 10.1200/jco.2017.75.6155.
- (133) SLEDGE, GEORGE W. *et al.* - **MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2– Advanced Breast Cancer Who Had**

**Progressed While Receiving Endocrine Therapy.** Journal of Clinical Oncology. 35:25 (2017) 2875-2884. doi: 10.1200/jco.2017.73.7585.

(134) FRUMAN, DAVID A.; ROMMEL, CHRISTIAN - **PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities.** Nature Reviews Drug Discovery. 13:2 (2014) 140-156. doi: 10.1038/nrd4204.

(135) BASELGA, JOSÉ - **Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer.** The Oncologist. 16:S1 (2011) 12-19. doi: 10.1634/theoncologist.2011-s1-12.

(136) CARRAWAY, HETTY; HIDALGO, MANUEL - **New targets for therapy in breast cancer: Mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists.** Breast Cancer Research. 6:5 (2004). doi: 10.1186/bcr927.

(137) KATSO, ROY *et al.* - **Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. 17:1 (2001) 615-675. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.

(138) CANTLEY, L. C. - **The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway.** Science. 296:5573 (2002) 1655-1657. doi: 10.1126/science.296.5573.1655.

(139) DOWLING, RYAN J.O. *et al.* - **Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1804:3 (2010) 433-439. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.001.

(140) SHIMOBAYASHI, MITSUGU; HALL, MICHAEL N. - **Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk.** Nature Reviews Molecular Cell Biology. 15:3 (2014) 155-162. doi: 10.1038/nrm3757.

(141) ŠTUDENTOVÁ, HANA; VITÁSKOVÁ, DENISA; MELICHAR, BOHUSLAV - **Safety of mTOR inhibitors in breast cancer.** Expert Opinion on Drug Safety. 15:8 (2016) 1075-1085. doi: 10.1080/14740338.2016.1192604.

(142) SHAPIRO, G. I. *et al.* - **Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of SAR245408 (XL147), an Oral Pan-Class I PI3K Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors.** Clinical Cancer Research. 20:1 (2013) 233-245. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-1777.

- (143) LORUSSO, P. *et al.* - **A phase I dose-escalation study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics of XL765, a PI3K/TORC1/TORC2 inhibitor administered orally to patients (pts) with advanced solid tumors.** *Journal of Clinical Oncology*. 27:15 (2009) 3502-3502.
- (144) DAVIES, B. R. *et al.* - **Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background.** *Molecular Cancer Therapeutics*. 11:4 (2012) 873-887. doi: 10.1158/1535-7163.mct-11-0824-t.
- (145) HIRAI, H. *et al.* - **MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo.** *Molecular Cancer Therapeutics*. 9:7 (2010) 1956-1967. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-1012.
- (146) PAL, SUMANTA KUMAR *et al.* - **Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer.** *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 19:11 (2010) 1355-1366. doi: 10.1517/13543784.2010.520701.
- (147) MCCUBREY, JAMES A. *et al.* - **Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1773:8 (2007) 1263-1284. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.
- (148) NAGARIA, TEDDY S. *et al.* - **Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems.** *Oncotarget*. 8:46 (2017). doi: 10.18632/oncotarget.20534.
- (149) CHANG, F. *et al.* - **Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy.** *Leukemia*. 17:3 (2003) 590-603. doi: 10.1038/sj.leu.2402824.
- (150) HILGER, R.A.; SCHEULEN, M.E.; STRUMBERG, D. - **The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer.** *Oncology Research and Treatment*. 25:6 (2002) 511-518. doi: 10.1159/000068621.

- (151) WELLBROCK, CLAUDIA; KARASARIDES, MARIA; MARAIS, RICHARD - **The RAF proteins take centre stage.** Nature Reviews Molecular Cell Biology. 5:11 (2004) 875-885. doi: 10.1038/nrml498.
- (152) HOEFLICH, K. P. *et al.* - **In vivo Antitumor Activity of MEK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Basal-Like Breast Cancer Models.** Clinical Cancer Research. 15:14 (2009) 4649-4664. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-0317.
- (153) SAMATAR, AHMED A.; POULIKAKOS, POULIKOS I. - **Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges.** Nature Reviews Drug Discovery. 13:12 (2014) 928-942. doi: 10.1038/nrd4281.
- (154) RINEHART, JOHN *et al.* - **Multicenter Phase II Study of the Oral MEK Inhibitor, CI-1040, in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung, Breast, Colon, and Pancreatic Cancer.** Journal of Clinical Oncology. 22:22 (2004) 4456-4462. doi: 10.1200/jco.2004.01.185.
- (155) YEH, T. C. *et al.* - **Biological Characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a Potent, Highly Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor.** Clinical Cancer Research. 13:5 (2007) 1576-1583. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-1150.
- (156) BOASBERG, PETER D. *et al.* - **Pilot study of PD-0325901 in previously treated patients with advanced melanoma, breast cancer, and colon cancer.** Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 68:2 (2011) 547-552. doi: 10.1007/s00280-011-1620-1.
- (157) DE LUCA, ANTONELLA *et al.* - **The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches.** Expert Opinion on Therapeutic Targets. 16:2 (2012) 17-27. doi: 10.1517/14728222.2011.639361.
- (158) JOKINEN, ELINA; LAURILA, NIINA; KOIVUNEN, JUSSI P. - **Alternative dosing of dual PI3K and MEK inhibition in cancer therapy.** BMC Cancer. 12:1 (2012). doi: 10.1186/1471-2407-12-612.
- (159) SHIMIZU, T. *et al.* - **The Clinical Effect of the Dual-Targeting Strategy Involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK Pathways in Patients with Advanced**

**Cancer.** Clinical Cancer Research. 18:8 (2012) 2316-2325. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-11-2381.

(160) DONG, QIAN *et al.* - **A novel hydrogen sulfide-releasing donor, HA-ADT, suppresses the growth of human breast cancer cells through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways.** Cancer Letters. 455 (2019) 60-72. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.031.

(161) AMÉ, JEAN-CHRISTOPHE; SPENLEHAUER, CATHERINE; DE MURCIA, GILBERT - **The PARP superfamily.** BioEssays. 26:8 (2004) 882-893. doi: 10.1002/bies.20085.

(162) SCHREIBER, VALÉRIE *et al.* - **Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.** Nature Reviews Molecular Cell Biology. 7:7 (2006) 517-528. doi: 10.1038/nrml1963.

(163) DE VOS, MIKE; SCHREIBER, VALÉRIE; DANTZER, FRANÇOISE - **The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art.** Biochemical Pharmacology. 84:2 (2012) 137-146. doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.018.

(164) SCHREIBER, VALÉRIE *et al.* - **Poly(ADP-ribose) Polymerase-2 (PARP-2) Is Required for Efficient Base Excision DNA Repair in Association with PARP-1 and XRCC1.** Journal of Biological Chemistry. 277:25 (2002) 23028-23036. doi: 10.1074/jbc.m202390200.

(165) BRYANT, HELEN E. *et al.* - **Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.** Nature. 434:7035 (2005) 913-917. doi: 10.1038/nature03443.

(166) FARMER, HANNAH *et al.* - **Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.** Nature. 434:7035 (2005) 917-921. doi: 10.1038/nature03445.

(167) MORENO-LAMA, LUCIA *et al.* - **Coordinated signals from PARP-1 and PARP-2 are required to establish a proper T cell immune response to breast tumors in mice.** Oncogene. 39:13 (2020) 2835-2843. doi: 10.1038/s41388-020-1175-x.

- (168) FONG, PETER C. *et al.* - **Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers.** *New England Journal of Medicine.* 361:2 (2009) 123-134. doi: 10.1056/nejmoa0900212.
- (169) TUTT, ANDREW *et al.* - **Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial.** *The Lancet.* 376:9737 (2010) 235-244. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60892-6.
- (170) SANDHU, SHAHNEEN K. *et al.* - **The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase I dose-escalation trial.** *The Lancet Oncology.* 14:9 (2013) 882-892. doi: 10.1016/s1470-2045(13)70240-7.
- (171) WILSON, RICHARD H. *et al.* - **A phase I study of intravenous and oral rucaparib in combination with chemotherapy in patients with advanced solid tumours.** *British Journal of Cancer.* 116:7 (2017) 884-892. doi: 10.1038/bjc.2017.36.
- (172) ROCHE, H. *et al.* - **A phase 3 study of the oral PARP inhibitor talazoparib (BMN 673) in BRCA mutation subjects with advanced breast cancer (EMBRACA).** *Annals of Oncology.* 26:2 (2015) ii16. doi: 10.1093/annonc/mdv090.1.
- (173) SHYR, DEREK; LIU, QI - **Next generation sequencing in cancer research and clinical application.** *Biological Procedures Online.* 15:4 (2013). doi: 10.1186/1480-9222-15-4.
- (174) KAMPS, RICK *et al.* - **Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification.** *International Journal of Molecular Sciences.* 18:2 (2017) 308. doi: 10.3390/ijms18020308.
- (175) CLARK, MICHAEL J. *et al.* - **Performance comparison of exome DNA sequencing technologies.** *Nature Biotechnology.* 29:10 (2011) 908-914. doi: 10.1038/nbt.1975.
- (176) KAUR, HITCHINTAN *et al.* - **Next-generation sequencing: a powerful tool for the discovery of molecular markers in breast ductal carcinoma in situ.** *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 13:2 (2013) 151-165. doi: 10.1586/erm.13.4.

- (177) TAN, RENJIE *et al.* - **An Evaluation of Copy Number Variation Detection Tools from Whole-Exome Sequencing Data.** *Human Mutation.* 35:7 (2014) 899-907. doi: 10.1002/humu.22537.
- (178) RHODES, DANIEL R.; CHINNAIYAN, ARUL M. - **Integrative analysis of the cancer transcriptome.** *Nature Genetics.* 37:6 (2005) 31-37. doi: 10.1038/ng1570.
- (179) ZHAO, WEIHONG; LUO, JIANCHENG; JIAO, SHUNCHANG - **Comprehensive characterization of cancer subtype associated long non-coding RNAs and their clinical implications.** *Scientific Reports.* 4:1 (2014). doi: 10.1038/srep06591.
- (180) UHLEN, MATHIAS *et al.* - **A pathology atlas of the human cancer transcriptome.** *Science.* 357:6352 (2017) 2507. doi: 10.1126/science.aan2507.
- (181) ZENG, JENNIFER *et al.* - **Whole transcriptome analysis identifies upregulated genes and pathways in ductal carcinoma in situ mimicking usual ductal hyperplasia.** *Human Pathology: Case Reports.* 17 (2019) 200308. doi: 10.1016/j.hpcr.2019.200308.
- (182) RAJKUMAR, THANGARAJAN *et al.* - **Targeted Resequencing of 30 Genes Improves the Detection of Deleterious Mutations in South Indian Women with Breast and/or Ovarian Cancers.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 16:13 (2015) 5211-5217. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.13.5211.
- (184) STRAVER, MARIEKE E. *et al.* - **The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 119:3 (2009) 551-558. doi: 10.1007/s10549-009-0333-1.
- (185) KNAUER, MICHAEL *et al.* - **The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 120:3 (2010) 655-661. doi: 10.1007/s10549-010-0814-2.
- (186) GLÜCK, STEFAN *et al.* - **Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 139:3 (2013) 759-767. doi: 10.1007/s10549-013-2572-4.



- (188) FLANAGAN, MELINA B. *et al.* - **Histopathologic variables predict Oncotype DX™ Recurrence Score.** *Modern Pathology.* 21:10 (2008) 1255-1261. doi: 10.1038/modpathol.2008.54.
- (189) SPARANO, JOSEPH A. *et al.* - **Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer.** *New England Journal of Medicine.* 373:21 (2015) 2005-2014. doi: 10.1056/nejmoa1510764.
- (191) FILIPITS, MARTIN *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.* 20:5 (2014) 1298-1305. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-1845.
- (192) LIEDTKE, CORNELIA *et al.* - **Genomic Grade Index Is Associated With Response to Chemotherapy in Patients With Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 27:19 (2009) 3185-3191. doi: 10.1200/jco.2008.18.5934.
- (193) FILHO, OTTO METZGER; IGNATIADIS, MICHAEL; SOTIRIOU, CHRISTOS - **Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 77:1 (2011) 20-29. doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.01.011.
- (194) METZGER-FILHO, OTTO *et al.* - **Genomic Grade Index (GGI): Feasibility in Routine Practice and Impact on Treatment Decisions in Early Breast Cancer.** *PLoS ONE.* 8:8 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0066848.
- (195) 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.* 14:9 (2008) 2601-2608. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-5026.
- (196) 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.* 104:11 (2011) 1762-1769. doi: 10.1038/bjc.2011.145.
- (197) ZHANG, Y. *et al.* - **Breast Cancer Index Identifies Early-Stage Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients at Risk for Early- and Late-Distant**

**Recurrence.** *Clinical Cancer Research*. 19:15 (2013) 4196-4205. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-0804.

(198) BARTLETT, J. M. S. *et al.* - **Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen—To Offer More? (aTTom) trial.** *Annals of Oncology*. 30:11 (2019) 1776-1783. doi: 10.1093/annonc/mdz289.

(200) MOSS, J. *et al.* - **Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer.** *Annals of Oncology*. 31:3 (2020) 395-403. doi: 10.1016/j.annonc.2019.11.014.

(201) CROWLEY, EMILY *et al.* - **Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood.** *Nature Reviews Clinical Oncology*. 10:8 (2013) 472-484. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.

(202) LOBERG, ROBERT D. *et al.* - **Detection and Isolation of Circulating Tumor Cells in Urologic Cancers: A Review.** *Neoplasia*. 6:4 (2004) 302-309. doi: 10.1593/neo.03484.

(203) KANWAR, NISHA *et al.* - **Identification of genomic signatures in circulating tumor cells from breast cancer.** *International Journal of Cancer*. 137:2 (2015) 332-344. doi: 10.1002/ijc.29399.

(204) KREBS, MATTHEW G. *et al.* - **Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes.** *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2:6 (2010) 351-365. doi: 10.1177/1758834010378414.

(205) CRISTOFANILLI, MASSIMO *et al.* - **Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology*. 23:7 (2005) 1420-1430. doi: 10.1200/jco.2005.08.140.

(206) HAYES, D. F. - **Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival.** *Clinical Cancer Research*. 12:14 (2006) 4218-4224. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-2821.

- (207) PANTEL, KLAUS; ALIX-PANABIÈRES, CATHERINE - **The clinical significance of circulating tumor cells.** *Nature Clinical Practice Oncology*. 4:2 (2007) 62-63. doi: 10.1038/ncponc0737.
- (208) PANTEL, KLAUS; BRAKENHOFF, RUUD H. - **Dissecting the metastatic cascade.** *Nature Reviews Cancer*. 4:6 (2004) 448-456. doi: 10.1038/nrc1370.
- (209) MULLER, V. *et al.* - **Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity.** *Clinical Cancer Research*. 11:10 (2005) 3678-3685. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-2469.
- (210) BRAUN, STEPHAN *et al.* - **Lack of Effect of Adjuvant Chemotherapy on the Elimination of Single Dormant Tumor Cells in Bone Marrow of High-Risk Breast Cancer Patients.** *Journal of Clinical Oncology*. 18:1 (2000) 80-80. doi: 10.1200/jco.2000.18.1.80.
- (211) SLADE, MARTIN J. *et al.* - **Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: Results at 4 years.** *International Journal of Cancer*. 114:1 (2004) 94-100. doi: 10.1002/ijc.20655.
- (212) HARTKOPF, ANDREAS D. *et al.* - **Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients – Results from a large single-centre analysis.** *European Journal of Cancer*. 50:15 (2014) 2550-2559. doi: 10.1016/j.ejca.2014.06.025.
- (213) BALIC, M. *et al.* - **Most Early Disseminated Cancer Cells Detected in Bone Marrow of Breast Cancer Patients Have a Putative Breast Cancer Stem Cell Phenotype.** *Clinical Cancer Research*. 12:19 (2006) 5615-5621. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-0169.
- (214) LIU, RUI *et al.* - **The Prognostic Role of a Gene Signature from Tumorigenic Breast-Cancer Cells.** *New England Journal of Medicine*. 356:3 (2007) 217-226. doi: 10.1056/nejmoa063994.

- (215) MOLLOY, TIMOTHY J. *et al.* - **The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients.** *Breast Cancer Research.* 13:3 (2011). doi: 10.1186/bcr2898.
- (216) MIGNOT, FABIEN *et al.* - **Disseminated Tumor Cells Predict Efficacy of Regional Nodal Irradiation in Early Stage Breast Cancer.** *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics.* 103:2 (2019) 389-396. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.09.033.
- (217) MIRNEZAMI, REZA; NICHOLSON, JEREMY; DARZI, ARA - **Preparing for Precision Medicine.** *New England Journal of Medicine.* 366:6 (2012) 489-491. doi: 10.1056/nejmp1114866.
- (218) ZARIC, GREGORY S. - **Cost Implications of Value-Based Pricing for Companion Diagnostic Tests in Precision Medicine.** *PharmacoEconomics.* 34:7 (2016) 635-644. doi: 10.1007/s40273-016-0388-x.
- (219) KUFEL, DONALD; WEICHSELBAUM, RALPH - **Radiation Therapy—Activation of Gene Transcription and the Development of Genetic Radiotherapy: Therapeutic Strategies in Oncology.** *Cancer Biology & Therapy.* 2:4 (2003) 326-329. doi: 10.4161/cbt.2.4.495.
- (220) TORRES-ROCA, JAVIER F. *et al.* - **Prediction of Radiation Sensitivity Using a Gene Expression Classifier.** *Cancer Research.* 65:16 (2005) 7169-7176. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0656.
- (221) YUAN, ZHIGANG *et al.* - **Intrinsic radiosensitivity, genomic-based radiation dose and patterns of failure of penile cancer in response to adjuvant radiation therapy.** *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy.* 24:6 (2019) 593-599. doi: 10.1016/j.rpor.2019.09.006.
- (222) ESCHRICH, STEVEN A. *et al.* - **A Gene Expression Model of Intrinsic Tumor Radiosensitivity: Prediction of Response and Prognosis After Chemoradiation.** *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics.* 75:2 (2009) 489-496. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.014.

- (223) ESCHRICH, STEVAN A. *et al.* - **Validation of a Radiosensitivity Molecular Signature in Breast Cancer.** *Clinical Cancer Research.* 18:18 (2012) 5134-5143. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-12-0891.
- (224) GØTZSCHE, PETER C.; JØRGENSEN, KARSTEN JUHL - **Screening for breast cancer with mammography.** *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 6 (2013) doi: 10.1002/14651858.cd001877.pub5.
- (225) ERNSTER, VIRGINIA L.; BARCLAY, JOHN - **Increases in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS) of the Breast in Relation to Mammography: A Dilemma.** *JNCI Monographs.* 1997:22 (1997) 151-156. doi: 10.1093/jncimono/1997.22.151.
- (226) ERNSTER, V. L. - **Detection of Ductal Carcinoma In Situ in Women Undergoing Screening Mammography.** *CancerSpectrum Knowledge Environment.* 94:20 (2002) 1546-1554. doi: 10.1093/jnci/94.20.1546.
- (227) KLABUNDE, CARRIE N.; BALLARD-BARBASH, RACHEL - **Evaluating Population-Based Screening Mammography Programs Internationally.** *Seminars in Breast Disease.* 10:2 (2007) 102-107. doi: 10.1053/j.sembd.2007.09.007.
- (228) SARDANELLI, FRANCESCO *et al.* - **Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey.** *European Radiology.* 27:7 (2016) 2737-2743. doi: 10.1007/s00330-016-4612-z.
- (229) SHIEH, YIWEY *et al.* - **Population-based screening for cancer: hope and hype.** *Nature Reviews Clinical Oncology.* 13:9 (2016) 550-565. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.50.
- (230) KERLIKOWSKE, KARLA *et al.* - **Efficacy of Screening Mammography.** *JAMA.* 273:2 (1995) 149. doi: 10.1001/jama.1995.03520260071035
- (231) SALZMANN, PETER - **Cost-Effectiveness of Extending Screening Mammography Guidelines To Include Women 40 to 49 Years of Age.** *Annals of Internal Medicine.* 127:11 (1997) 955. doi: 10.7326/0003-4819-127-11-199712010-00001.

- (232) MANDELBLATT, JEANNE S. *et al.* - **Effects of Mammography Screening Under Different Screening Schedules: Model Estimates of Potential Benefits and Harms.** *Annals of Internal Medicine.* 151:10 (2009) 738. doi: 10.7326/0003-4819-151-10-200911170-00010.
- (233) BOYD, NORMAN F. *et al.* - **Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer.** *New England Journal of Medicine.* 356:3 (2007) 227-236. doi: 10.1056/nejmoa062790.
- (234) PASHAYAN, N. *et al.* - **Polygenic susceptibility to prostate and breast cancer: implications for personalised screening.** *British Journal of Cancer.* 104:10 (2011) 1656-1663. doi: 10.1038/bjc.2011.118.
- (235) SCHOUSBOE, JOHN T. *et al.* - **Personalizing Mammography by Breast Density and Other Risk Factors for Breast Cancer: Analysis of Health Benefits and Cost-Effectiveness.** *Annals of Internal Medicine.* 155:1 (2011) 10. doi: 10.7326/0003-4819-155-1-201107050-00003.
- (237) SARDANELLI, FRANCESCO *et al.* - **Mammography: an update of the EUSOBI recommendations on information for women.** *Insights into Imaging.* 8:1 (2016) 11-18. doi: 10.1007/s13244-016-0531-4.
- (238) LEE, CAROL H. *et al.* - **Breast Cancer Screening With Imaging: Recommendations From the Society of Breast Imaging and the ACR on the Use of Mammography, Breast MRI, Breast Ultrasound, and Other Technologies for the Detection of Clinically Occult Breast Cancer.** *Journal of the American College of Radiology.* 7:1 (2010) 18-27. doi: 10.1016/j.jacr.2009.09.022.
- (239) MANN, RITSE M. *et al.* - **Breast MRI: EUSOBI recommendations for women's information.** *European Radiology.* 25:12 (2015) 3669-3678. doi: 10.1007/s00330-015-3807-z.
- (240) BAHRI, S. *et al.* - **Can dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) predict tumor recurrence and lymph node status in patients with breast cancer?.** *Annals of Oncology.* 19:4 (2008) 822-824. doi: 10.1093/annonc/mdn043.

- (241) BURNSIDE, ELIZABETH S. *et al.* - **Using computer-extracted image phenotypes from tumors on breast magnetic resonance imaging to predict breast cancer pathologic stage.** *Cancer*. 122:5 (2015) 748-757. doi: 10.1002/cncr.29791.
- (242) SUTTON, ELIZABETH J. *et al.* - **Breast cancer subtype intertumor heterogeneity: MRI-based features predict results of a genomic assay.** *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 42:5 (2015) 1398-1406. doi: 10.1002/jmri.24890.
- (243) ZHU, YITAN *et al.* - **Deciphering Genomic Underpinnings of Quantitative MRI-based Radiomic Phenotypes of Invasive Breast Carcinoma.** *Scientific Reports*. 5:1 (2015). doi: 10.1038/srep17787.
- (244) LI, HUI *et al.* - **Quantitative MRI radiomics in the prediction of molecular classifications of breast cancer subtypes in the TCGA/TCIA data set.** *npj Breast Cancer*. 2:1 (2016). doi: 10.1038/npjbcancer.2016.12.
- (245) LI, HUI *et al.* - **MR Imaging Radiomics Signatures for Predicting the Risk of Breast Cancer Recurrence as Given by Research Versions of MammaPrint, Oncotype DX, and PAM50 Gene Assays.** *Radiology*. 281:2 (2016b) 382-391. doi: 10.1148/radiol.2016152110.
- (246) LINDEN, HANNAH M. *et al.* - **Quantitative Fluoroestradiol Positron Emission Tomography Imaging Predicts Response to Endocrine Treatment in Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology*. 24:18 (2006) 2793-2799. doi: 10.1200/jco.2005.04.3810.
- (247) DEHDASHTI, FARROKH *et al.* - **PET-based estradiol challenge as a predictive biomarker of response to endocrine therapy in women with estrogen-receptor-positive breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment*. 113:3 (2008) 509-517. doi: 10.1007/s10549-008-9953-0.
- (248) ROUSSEAU, CAROLINE *et al.* - **Monitoring of Early Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Stage II and III Breast Cancer by [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography.** *Journal of Clinical Oncology*. 24:34 (2006) 5366-5372. doi: 10.1200/jco.2006.05.7406.

- (249) DUNNWARD, L. K. *et al.* - **PET Tumor Metabolism in Locally Advanced Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy: Value of Static versus Kinetic Measures of Fluorodeoxyglucose Uptake.** *Clinical Cancer Research.* 17:8 (2011) 2400-2409. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-2649.
- (250) DIJKERS, ELI *et al.* - **Immunoscintigraphy as Potential Tool in the Clinical Evaluation of HER2/neu Targeted Therapy.** *Current Pharmaceutical Design.* 14:31 (2008) 3348-3362. doi: 10.2174/138161208786549425.
- (251) VAN DER VELDT, A. A. M. *et al.* - **Quantitative Parametric Perfusion Images Using I50-Labeled Water and a Clinical PET/CT Scanner: Test-Retest Variability in Lung Cancer.** *Journal of Nuclear Medicine.* 51:11 (2010) 1684-1690. doi: 10.2967/jnumed.110.079137.
- (252) CERUSSI, ALBERT *et al.* - **In vivo absorption, scattering, and physiologic properties of 58 malignant breast tumors determined by broadband diffuse optical spectroscopy.** *Journal of Biomedical Optics.* 11:4 (2006) 44005. doi: 10.1117/1.2337546.
- (253) CERUSSI, A. *et al.* - **Predicting response to breast cancer neoadjuvant chemotherapy using diffuse optical spectroscopy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104:10 (2007) 4014-4019. doi: 10.1073/pnas.0611058104.
- (254) EVANS, ANDREW *et al.* - **Quantitative shear wave ultrasound elastography: initial experience in solid breast masses.** *Breast Cancer Research.* 12:6 (2010). doi: 10.1186/bcr2787.
- (255) SADEGHI-NAINI, A. *et al.* - **Quantitative Ultrasound Evaluation of Tumor Cell Death Response in Locally Advanced Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy.** *Clinical Cancer Research.* 19:8 (2013) 2163-2174. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-12-2965.
- (256) SHIA, WEI-CHUNG *et al.* - **Effectiveness of evaluating tumor vascularization using 3D power Doppler ultrasound with high-definition flow technology in the prediction of the response to neoadjuvant chemotherapy for T2 breast cancer: a preliminary report.** *Physics in Medicine and Biology.* 60:19 (2015) 7763-7778. doi: 10.1088/0031-9155/60/19/7763.



(258) FERNALD, GUY HASKIN *et al.* - **Bioinformatics challenges for personalized medicine.** *Bioinformatics.* 27:13 (2011) 1741-1748. doi: 10.1093/bioinformatics/btr295.

(259) MCGUIRE, AMY L.; CAULFIELD, TIMOTHY; CHO, MILDRED K. - **Research ethics and the challenge of whole-genome sequencing.** *Nature Reviews Genetics.* 9:2 (2008) 152-156. doi: 10.1038/nrg2302.

(260) ELKIN, ELENA B.; BACH, PETER B. - **Cancer's Next Frontier. Addressing high and Increasing Costs.** *JAMA.* 303:11 (2010) 1086. doi: 10.1001/jama.2010.283.

(261) HAYES, DANIEL F. - **Considerations for Implementation of Cancer Molecular Diagnostics Into Clinical Care.** *American Society of Clinical Oncology Educational Book.* 36 (2016) 292-296. doi: 10.1200/edbk\_160236.

## Webgrafia

- (1) **Cancer today** – (2020). [Consult. 8 jan. 2020]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>
- (2) **The global burden of disease: 2004 update** - (2020). [Consult. 8 jan. 2020]. Disponível em: [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf?ua=1](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua=1)
- (5) **White House Precision Medicine Initiative** – (2020). [Consult. 10 mar. 2020]. Disponível em: <https://obamawhitehouse.archives.gov/precision-medicine>
- (14) **Cancer tomorrow** – (2020). [Consult. 8 jan. 2020]. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0&population=900&mode=population&sex=2&cancer=39&age\\_group=value&apc\\_male=0&apc\\_female=0](https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0&population=900&mode=population&sex=2&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0)
- (25) **Breast Cancer Risk Factors You Cannot Change | Genetic Risk Factors** – (2020). [Consult. 19 jan. 2020]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/breast-cancer-risk-factors-you-cannot-change.html>
- (40) **Guidance | NICE** – (2020). [Consult. 18 jan. 2020]. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg164/chapter/Recommendations#clinical-significance-of-a-family-history-of-breast-cancer>
- (122) **BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource** (2020). [Consult. 20 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
- (183) **MammaPrint Test | Agendia** – (2020). [Consult. 26 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.agendia.com/our-tests/mammaprint>
- (187) **Oncotype DX tests | Oncotype IQ®** - (2020). [Consult. 26 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.oncotypeiq.com/en-US>
- (190) **NanoString Technologies, Inc. :: Prosigna® UK** – (2020). [Consult. 29 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.nanostring.com/diagnostics/prosigna-uk>
- (199) **Breast Cancer Index** – (2020). [Consult. 29 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.breastcancerindex.com>
- (236) **Wisdom Study (Women Informed to Screen Depending on Measures of Risk) (NCT02620852)** - Full Text View - ClinicalTrials.gov – (2020). [Consult. 22 mar. 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02620852>

(257) **I-SPY 2 TRIAL: Neoadjuvant and Personalized Adaptive Novel Agents to Treat Breast Cancer (NCT01042379)** - Full Text View - ClinicalTrials.gov – (2020). [Consult. 20 abr. 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01042379>

(262) **TAPUR (Testing the Use of Food and Drug Administration (FDA) Approved Drugs That Target a Specific Abnormality in a Tumor Gene in People With Advanced Stage Cancer) (NCT02693535)** - (2020). [Consult. 30 mar. 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02693535>

(263) **IMPACT II (Molecular Profiling and Targeted Therapy in Treating Patients With Metastatic Cancer) (NCT02152254)** - Full Text View - ClinicalTrials.gov – (2020). [Consult. 30 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02152254>