

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO FARMACOGENÉTICO E FARMACOECONÔMICO EM  
PACIENTES BRASILEIRAS PORTADORAS DE CÂNCER DE  
MAMA TRATADAS COM INIBIDORES DA AROMATASE**

Oswaldo Alfonso Pinto Artigalás

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ashton-Prolla

Porto Alegre, março de 2015.

Esse trabalho foi realizado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, no Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC), no Hospital Femina (HFE), e no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com apoio financeiro da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq/UFRGS), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, ajudaram na conclusão desse trabalho.

Às Agências Financiadoras deste Projeto, Propesq/UFRGS, FIPE/HCPA, FAPERGS e CNPq, e as instituições colaboradoras: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Femina e Hospital Nossa Senhora da Conceição, pelo incentivo à pesquisa sobre o câncer de mama.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pela dedicação e disponibilidade infindáveis nestes anos de convívio. Em especial, a Profa Mara Hutz e Tazio Vanni, colaboradores essenciais para a concretização desse trabalho.

À minha orientadora Profa Ida Schwartz e a minha co-orientadora Profa Patrícia Ashton-Prolla, pelos exemplos de excelência na Ciência brasileira e que desde muitos anos têm me proporcionado oportunidades de crescimento profissional incomparáveis.

A todos os co-autores e colaboradores dos artigos desenvolvidos, devo citar especialmente aqueles que foram fundamentais: Fernanda Bitencourt, Fernanda Sperb-Ludwig, Christina Oppermann, José Pedrini, Pedro Liedke e Rodrigo Perez Pereira.

Agradeço também a todos os alunos de iniciação científica que em algum momento nesses quatro anos participaram da pesquisa, sendo assim, muito importantes para o desenvolvimento da mesma.

Aos meus familiares e amigos, pela compreensão e apoio nesse período.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	7
Lista de figuras e tabelas	12
Resumo	13
Abstract	15
<b>Capítulo I - Introdução</b>	<b>17</b>
1.1 Câncer de Mama	18
1.1.1 Epidemiologia	19
1.1.2 Patologia	19
1.1.3 Fatores de risco	22
1.1.3.1 Fatores familiares	23
1.1.3.2 Predisposição hereditária ao câncer de mama	25
1.1.3.3 Fatores hormonais	27
1.1.3.4 Fatores dietéticos e de estilo de vida	29
1.1.4 Diagnóstico	30
1.1.5 Tratamento	33
1.1.5.1 Cirurgia	33
1.1.5.2 Quimioterapia	35
1.1.5.3 Radioterapia	37
1.1.5.4 Hormonioterapia	38
1.1.5.5 Outras opções terapêuticas	39
1.1.6 Prognóstico	41
1.2 Inibidores da Aromatase	44
1.2.1 Características farmacológicas dos inibidores da aromatase	46
1.2.1.1 Anastrozol	46
1.2.1.2 Letrozol	47
1.2.1.3 Exemestano	49
1.2.2 Indicações terapêuticas	51
1.2.3 Efeitos adversos e toxicidade	55

1.3 Farmacogenética	57
1.3.1 Farmacogenética do câncer de mama	61
1.3.2 Farmacogenética dos inibidores da aromatase	65
1.4 Farmacoeconomia	67
1.4.1 Aspectos farmacoencômicos da testagem farmacogenética na prática clínica	68
1.4.2 Farmacoeconomia do câncer de mama	70
1.4.3 Farmacoeconomia dos inibidores da aromatase no Brasil	72
<b>Capítulo II – Justificativa</b>	74
2. Justificativa	75
<b>Capítulo III – Objetivos</b>	76
3.1 Objetivo geral	77
3.2 Objetivos específicos	77
<b>Capítulo IV – Artigo 1</b>	79
Influence of CYP19 polymorphisms on the treatment of breast cancer with aromatase inhibitors: a systematic review and meta-analysis	80
<b>Capítulo V – Artigo 2</b>	105
Desfechos clínicos em mulheres com câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase estão associados a polimorfismos dos genes <i>CYP19A1</i> e <i>HSD17B1</i>	106
<b>Capítulo VI – Artigo 3</b>	125
Genetic variants are associated with adverse effects in women with breast cancer treated with aromatase inhibitors	126

<b>Capítulo VII – Artigo 4</b>	149
Análise comparativa dos custos de inibidores da aromatase de terceira geração no tratamento do câncer de mama na perspectiva do Sistema Único de Saúde	150
<b>Capítulo VIII – Discussão</b>	166
8.1 Farmacogenética da resposta clínica aos inibidores da aromatase	167
8.2 Farmacogenética dos efeitos adversos dos inibidores da aromatase	169
8.3 Farmacoeconomia dos inibidores da aromatase	170
<b>Capítulo IX – Perspectivas</b>	173
9. Perspectivas	174
<b>Capítulo X – Referências Bibliográficas</b>	176
10. Referências bibliográficas	177
<b>Capítulo XI - Anexos</b>	199
11.1 Anexo 1	200
11.2 Anexo 2	202
11.3 Anexo 3	203
11.4 Anexo 4	205
11.5 Anexo 5	206

## Lista de Abreviaturas

<b>3'UTR</b>	<i>3' Untranslated Region</i> - Região não traduzida 3'
<b>AC</b>	Análise de Custos
<b>ACS</b>	<i>American Cancer Society</i> - Sociedade Americana de Câncer
<b>ACTH</b>	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> - Hormônio adrenocorticotrófico
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i> – Comissão Conjunta Americana sobre o Câncer
<b>ASCO</b>	<i>American Society of Clinical Oncology</i> – Sociedade Americana de Oncologia Clínica
<b>BRCA1</b>	Gene <i>BRCA1 (Breast Cancer 1, Early Onset gene)</i> – gene do Câncer de mama 1, início precoce
<b>BRCA1</b>	Proteína <i>BRCA1 (Breast Cancer 1, Early Onset protein)</i> – proteína do Câncer de mama 1, início precoce
<b>BRCA2</b>	Gene <i>BRCA2 (Breast Cancer 2, Early Onset gene)</i> – gene do Câncer de mama 2, início precoce
<b>BRCA2</b>	Proteína <i>BRCA2 (Breast Cancer 2, Early Onset protein)</i> – proteína do Câncer de mama 2, início precoce
<b>CDH1</b>	Gene <i>CDH1 (Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin gene)</i> – gene da E-caderina 1
<b>CLI</b>	Carcinoma lobular invasor
<b>CLIS</b>	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
<b>CDI</b>	Carcinoma ductal invasor ou infiltrante
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>CYP19A1</b>	Gene <i>CYP19A1 (Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1 gene)</i> – gene do citocromo P450, família 19, subfamília A, polipeptídeo 1
<b>CYP2C8</b>	Gene <i>CYP2C8 (Cytochrome P450, Family 2, Subfamily C, Polypeptide 8 gene)</i> – gene do citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 8
<b>CYP2A6</b>	Gene <i>CYP2A6 (Cytochrome P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 6 gene)</i> – gene do citocromo P450, família 2,

	subfamília A, polipeptídeo 6
<b>CYP4A11</b>	Gene <i>CYP4A11</i> ( <i>Cytochrome P450, Family 4, Subfamily A, Polypeptide 11 gene</i> ) – gene do citocromo P450, família 4, subfamília A, polipeptídeo 11
<b>CYP3A4</b>	Gene <i>CYP3A4</i> ( <i>Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 4 gene</i> ) – gene do citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4
<b>CYP3A5</b>	Gene <i>CYP19A1</i> ( <i>Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5 gene</i> ) – gene do citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 5
<b>CYP2D6</b>	Gene <i>CYP19A1</i> ( <i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily D, Polypeptide 6 gene</i> ) – gene do citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
<b>DFS</b>	<i>Disease-free survival</i> - Sobrevida livre de doença
<b>E1</b>	Estrona
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EA</b>	Efeitos adversos
<b>ECR</b>	Ensaio clínico randomizado
<b>ESR1</b>	Gene <i>ESR1</i> ( <i>Estradiol nuclear receptor, Subfamily 3, Group A, Member 1 gene</i> ) – gene do receptor nuclear do estradiol, subfamília 3, grupo A, membro 1.
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
<b>FSH</b>	<i>Follicle-stimulating hormone</i> - Hormônio folículo-estimulante
<b>Gy</b>	Gray
<b>GST</b>	Enzima glutationa S-transferase
<b>GSTP1</b>	Gene <i>GSTP1</i> ( <i>Glutathione S-Transferase Pi 1 gene</i> ) – gene Glutaciona S-Transferase Pi 1



<b>GSTM1</b>	Gene <i>GSTM1</i> ( <i>Glutathione S-Transferase Mu 1 gene</i> ) – gene Glutathiona S-Transferase Mu 1
<b>GSTT1</b>	Gene <i>GSTT1</i> ( <i>Glutathione S-Transferase Theta 1</i> ) – gene Glutathiona S-Transferase Theta 1
<b>GWAS</b>	<i>Genome wide association study</i> – Estudo de Associação Genômica Ampla
<b>HDL</b>	<i>High-density Lipoprotein</i> - Lipoproteína de alta densidade
<b>HER2/neu</b>	Gene <i>HER2/neu</i> ( <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2 gene</i> ) – gene do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico tipo 2.
<b>HER2/neu</b>	Proteína HER2/neu
<b>HR</b>	<i>Hazard ratio</i> – razão de chances
<b>HSD17B1</b>	Gene <i>HSD17B1</i> ( <i>Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 gene</i> ) – gene da Hidroxisteróide-17-beta-dehidrogenase 1
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>IA</b>	Inibidor da aromatase
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i> - Hormônio folículo-estimulante
<b>LS</b>	Linfonodo sentinela
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mg/dia</b>	Miligramas por dia
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MMG</b>	Mamografia
<b>MnSOD</b>	Gene <i>MnSOD</i> ( <i>Manganese-Containing Superoxide Dismutase gene</i> ) – Gene da Superóxido Dismutase contendo Manganês
<b>MPO</b>	Gene <i>MPO</i> ( <i>Myeloperoxidase gene</i> ) – gene mieloperoxidase
<b>MTHFR</b>	Gene <i>MTHFR</i> ( <i>Methylenetetrahydrofolate Reductase gene</i> ) –

	gene Metilenotetrahidrofolato redutase
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i> – Instituto Nacional do Câncer (EUA)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	<i>Odds-ratio</i>
<b>OS</b>	<i>Overall survival</i> - Sobrevida total
<b>PAAF</b>	Punção aspirativa por agulha fina
<b>PFS</b>	<i>Progression-free survival</i> - sobrevida livre de progressão
<b>PGH</b>	Projeto Genoma Humano
<b>QALY</b>	<i>Quality-adjusted life-year gained</i> – Anos de vida ajustados para a qualidade
<b>RCBP</b>	Registro de Câncer de Base Populacional
<b>RE</b>	Receptores de estrogênio
<b>RFS</b>	<i>Relapse-free survival</i> – Sobrevida livre de recidiva
<b>RHC</b>	Registro Hospitalar de Câncer
<b>RNM</b>	Ressonância nuclear magnética
<b>RP</b>	Receptores de progesterona
<b>RR</b>	Risco relativo
<b>SEER</b>	Estudo <i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
<b>SERM<sub>s</sub></b>	<i>Selective estrogen receptors modulators</i> – Moduladores seletivos de receptors de estrogênio
<b>SIM</b>	Sistema de Informação sobre Mortalidade
<b>SNP</b>	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de base única
<b>SULT1A1</b>	Gene <i>SULT1A1</i> ( <i>Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 gene</i> ) – gene sulfotransferase, citosólica, 1A, fenol-preferente, membro 1
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCL1A</b>	Gene <i>TCL1A</i> ( <i>T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A gene</i> ) – gene linfoma/leucemia de células T 1A
<b>TRH</b>	Terapia de reposição hormonal
<b>UGT1A3</b>	Gene <i>UGT1A3</i> ( <i>UDP-Glucuronosyltransferase, Family 1, Polypeptide A3 gene</i> ) – gene UDP-Glucuronosiltransferase,

	família 1, polipeptídeo A3
<b>UGT1A4</b>	Gene <i>UGT1A4 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 1, Polypeptide A4 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 1, polipeptídeo A4
<b>UGT1A8</b>	Gene <i>UGT1A8 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 1, Polypeptide A8 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 1, polipeptídeo A8
<b>UGT1A10</b>	Gene <i>UGT1A10 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 1, Polypeptide A10 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 1, polipeptídeo A10
<b>UGT2B7</b>	Gene <i>UGT2B7 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 2, Polypeptide B7 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 1, polipeptídeo A3
<b>UGT2B15</b>	Gene <i>UGT2B15 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 2, Polypeptide B15 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 2, polipeptídeo B15
<b>UGT2B17</b>	Gene <i>UGT2B17 (UDP-Glucuronosyltransferase, Family 2, Polypeptide B17 gene)</i> – gene UDP-Glucuronosiltransferase, família 2, polipeptídeo B17
<b>USG</b>	Ultrassonografia mamária
<b>VOI</b>	<i>Value of information</i> – Valor de informação

## Lista de figuras e tabelas

<b>Figura 1</b>	Histologia do carcinoma de mama	22
<b>Figura 2</b>	Susceptibilidade genética ao câncer de mama	27
<b>Figura 3</b>	Mamografia com compressão local	32
<b>Figura 4</b>	Resumo das vias bioquímicas de estrogênios e locais de ação de fármacos antiestrogênicos	45
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do anastrozol	46
<b>Figura 6</b>	Metabolismo anastrozol	47
<b>Figura 7</b>	Estrutura química do letrozol	48
<b>Figura 8</b>	Metabolismo letrozol	49
<b>Figura 9</b>	Estrutura química do exemestano	49
<b>Figura 10</b>	Metabolismo exemestano	50
<b>Quadro 1</b>	Magnitude de risco de fatores de risco para câncer de mama	24
<b>Quadro 2</b>	Regimes de quimioterapia adjuvante padrão para estádios I, II, IIIA e IIIC operável em câncer de mama com <i>HER2/neu</i> negativo.	36
<b>Quadro 3</b>	Resultados dos principais estudos clínicos em contexto adjuvante comparando inibidores da aromatase de terceira geração e tamoxifeno.	52

## Resumo

**Introdução:** A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram mais de um milhão casos novos de câncer de mama (CM) em todo o mundo por ano. No Brasil, este é o câncer mais freqüente no país entre as mulheres (excluindo-se câncer de pele não-melanoma). Além disso, o CM constitui-se na primeira causa de morte, por câncer, entre as mulheres brasileiras. Estima-se que 60% a 75% dos CM em mulheres acima de 50 anos são hormônio sensível. A terapia com tamoxifeno por 5 anos foi considerada o tratamento de primeira linha para CM hormônio responsivo por décadas. No entanto, cerca de 30% dos CM hormônio sensível, inicialmente, são resistentes ao tamoxifeno, e outros 40% irão desenvolver eventual resistência. Com isso, novas alternativas foram desenvolvidas e ensaios clínicos têm indicado que os inibidores da aromatase (IA) são superiores ao tamoxifeno, tanto em eficácia quanto na ocorrência de efeitos adversos (EA). Apesar dessas vantagens descritas, os IA também apresentam índices de falha de tratamento, bem como um perfil de EA que pode levar à redução da adesão ao tratamento. Até o momento, não existem biomarcadores sensíveis e específicos que permitam a identificação de grupos de pacientes que venham a se beneficiar mais, nem quais são os mais suscetíveis aos EA dos IA.

**Objetivos:** Analisar os efeitos de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) sobre desfechos clínicos e EA dos IA, bem como realizar um estudo farmacoeconômico de análise de custos em pacientes tratadas com IA em hospitais terciários do Sistema Único de Saúde (SUS).

**Metodologia/Resultados: 1) Revisão sistemática e metanálise:** Foi realizada revisão sistemática e metanálise para determinar quais os SNPs do gene *CYP19A1* associam-se a desfechos clínicos e EA em mulheres tratadas com IA. Doze estudos foram incluídos na análise final. Houve uma significativa heterogeneidade entre as populações amostrais estudadas, SNPs e desfechos investigados. Dessa forma, foi possível metanalisar apenas o SNP rs4646 com relação ao tempo de progressão (TTP, do inglês *time to progression*) em mulheres com CM metastático tratadas com IA; as portadora da variante de rs4646 possuem TTP significativamente elevado quando comparadas a

portadoras do alelo selvagem (Hazard Ratio (HR)=0.51 [95%CI=0.33-0.78],  $p=0.002$ ). Mais da metade dos estudos incluídos ( $n = 7/12$ ) analisaram associação entre SNPs do gene *CYP19A1* e EA; embora uma associação estatisticamente significativa com efeitos adversos músculo-esqueléticos e sintomas vasomotores tenha sido encontrada, os resultados não se reproduziram em outras publicações, sugerindo a necessidade de mais estudos no assunto.

2) **Análises farmacogenéticas:** Nesta etapa do estudo foram incluídas 190 mulheres com CM e que fizeram uso de IA por pelo menos 4 semanas, oriundas de 3 diferentes hospitais do Rio Grande do Sul. As análises farmacogenéticas foram feitas por meio do estudo de 12 SNPs em quatro genes (*CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B1* e *TCL1A*). Foram encontradas associação entre o rs2830 e menores índices de remissão (OR=0,46; IC 95%= 0,22-0,93;  $p=0,032$ ); entre o rs7176005 e menor ocorrência de sobrevida livre de doença (OR= 0,42; IC95%= 0,18-0,94;  $p=0,036$ ); e entre o rs700519 e maior de sobrevida livre de doença (OR= 4,95, IC 95%= 1,01-35,4). Com relação aos EA dos IA, encontraram-se associação entre VMS e rs7176005 ( $p=0,038$ ), além de associação entre os rs10046 e rs2830 com menores índices de ocorrência de disfunção articular ( $p=0,002$ ) e osteoporose ( $p=0,042$ ), respectivamente.

3) **Análise farmacoeconômica:** Foi realizada análise dos custos relacionados ao uso dos três IAs no contexto do sistema do SUS brasileiro. Os custos finais, somatório dos dois períodos (inicial e seguimento de 12 meses), diferiram de forma significativa entre os três IA ( $p=0,014$ ). O custo final mensal para tratamento do CM com uso de anastrozol teve uma mediana de R\$188,03 (IQR=87,94-313,63), sendo significativamente inferior ao custo de tratamento com letrozol (mediana R\$244,44; IQR=151,42-432,95) ( $p=0,026$ ).

**Conclusões:** Os dados fármaco-epidemiológicos apresentados nesse trabalho reforçam a existência de associação de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo e mecanismo de ação dos IA com desfechos clínicos e frequência de EA adversos em mulheres com CM tratadas com essas medicações. Além disso, demonstrou-se que existem diferenças significativas nos custos de tratamento com IA em pacientes atendidas no sistema de saúde público brasileiro, indicando que estudos mais detalhados são necessários na otimização dos recursos para saúde.

## Abstract

**Introduction:** The World Health Organization estimated that there are over one million new cases of breast cancer (BC) worldwide per year. In Brazil, this is the most frequent cancer among women in the country (excluding non-melanoma skin cancer). In addition, BC constitutes the first cause of death from cancer among Brazilian women. It is estimated that 60% to 75% of BC in women over 50 are hormone sensitive. For decades, therapy with tamoxifen for 5 years was considered first-line treatment for hormone responsive BC. However, approximately 30% of hormone sensitive BC is initially resistant to tamoxifen, and another 40% will develop possible resistance. Therefore, new alternatives have been developed and clinical trials have shown that aromatase inhibitors (AI) are superior to tamoxifen in both efficacy and adverse effects (AE). Despite the advantages described, AI also have failure rates of treatment as well as an AE profile that can lead to reduced adherence to treatment. To date, there are no specific sensitive biomarkers that allow identification of which patient groups may have greater benefits, nor which are more susceptible to AE from AI. **Objectives:** To analyze the effects of single nucleotide polymorphisms (SNPs), on clinical outcomes and the AE from AI, as well as conduct a pharmacoeconomic study of cost analysis in patients treated with AI in public tertiary hospitals (SUS - Sistema Único de Saúde). **Methodology/Results:** 1) Systematic review and meta-analysis: systematic review and meta-analysis were performed to determine which SNPs of the *CYP19A1* gene are associated with clinical outcomes and AE in women treated with AI. Twelve studies were included in the final analysis. There was significant heterogeneity among the population samples studied, SNPs, and outcomes investigated. Thus, it was possible to meta-analyze only the SNP rs4646 with respect to time to progression (TTP), in women with metastatic BC treated with AI; the carriers of the rs4646 variant have significantly increased TTP compared to the wild type allele carriers (Hazard Ratio (HR)=0.51 [95% CI=0.33-0.78], p=0.002). More than half of the included studies (n=7/12) analyzed the association between SNPs of the gene *CYP19A1* and AE; although a statistically significant association of adverse effects with musculoskeletal and vasomotor

symptoms has been found, the results were not reproduced in other publications, suggesting the need for more studies on the subject. 2) Pharmacogenetic analysis: In this stage of the study, 190 women with BC who used AI for at least four weeks, coming from 3 different hospitals in Rio Grande do Sul, were included. The pharmacogenetic analyzes were made through the study of 12 SNPs in four genes (*CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B1*, and *TCL1A*). Association was found between rs2830 and lower remission rates (OR=0.46; 95% CI= 0.22 to 0.93; p=0.032); between rs7176005 and a lower incidence of disease-free survival (OR=0.42, 95% CI=0.18 to 0.94; p=0.036); and between rs700519 and increased disease-free survival (OR=4.95, 95% CI= 1.01 to 35.4). Regarding AE from AI, found an association between VMS and rs7176005 (p=0.038), and association between rs10046 and rs2830 with lower rates of occurrence of articular dysfunction (p=0.002) and osteoporosis (p=0.042), respectively. 3) pharmacoeconomic analysis: Analysis of the costs related to the use of the three AIs in the context of the Brazilian public health system (SUS) was performed. The final costs, sum of the two periods (initial and follow-up of 12 months), differed significantly between the three AI (p=0.014). The final monthly cost for BC treatment with anastrozole had a median of R\$ 188.03 (IQR=87.94 to 313.63) and was significantly lower than the cost of treatment with letrozole (median R\$ 244.44; IQR=151.42 to 432.95) (p=0.026). **Conclusions:** The pharmaco-epidemiological data presented here reinforce the existence of association of gene polymorphisms involved in the metabolism and mechanism of action of AI with clinical outcomes and the frequency of AE variations in women with BC treated with these medications. In addition, it was shown that there are significant differences in treatment costs with AI in patients treated in the Brazilian public health system, indicating that more detailed studies are needed in the optimization of health resources.



## **Capítulo I – Introdução**

---

## **1. Introdução**

### **1.1 Câncer de mama**

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública para as mulheres em todo o mundo (Allemani et al, 2014). Nos Estados Unidos, o câncer de mama continua sendo o tipo de câncer mais frequente em mulheres e a segunda causa de morte por câncer, sendo responsável por 27% dos casos de câncer e 15% das mortes por câncer no ano de 2009, o que se traduziu em 192.370 novos casos e 40.170 mortes. O câncer de mama também é a forma mais comum de câncer na Europa, representando cerca de 13,5% do total (Ferlay et al, 2013). Em todo o mundo, o câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, correspondendo por 23% do total de casos de câncer e 14% das mortes por câncer. (Jemal et al, 2011). Embora o câncer de mama seja, tradicionalmente, menos comum em países não industrializados, sua incidência nessas áreas está aumentando (Parkin & Bray, 2011).

#### **1.1.1 Epidemiologia**

Existe uma enorme variação mundial na ocorrência dos diversos tipos de câncer, tanto do ponto de vista temporal-histórico quanto do ponto de vista geográfico (Doll, 1998). O câncer de mama, por exemplo, é raro entre as populações rurais na Ásia, mas torna-se progressivamente mais comum entre os migrantes para as cidades urbanas da própria Ásia e, especialmente, naquelas que se deslocam para cidades do Ocidente (América do Norte e Europa) (Burstein et al, 2011). O conhecimento das frequências de ocorrência de câncer dentro de uma perspectiva global é fundamental, uma vez que o aumento mundial do número de casos não está mais restrito aos chamados países desenvolvidos (industrializados), mas também avançando nos grupos de países de baixa e média renda, que representam 80% da população mundial. Isso se deve, possivelmente, ao aumento da longevidade, redução da mortalidade infantil, diminuição das mortes por doenças infecciosas e modificação progressiva do estilo de vida (dieta, sedentarismo e tabagismo). Através dos padrões globais de

incidência e mortalidade por câncer e de como estes se relacionam fatores de risco identificáveis, é possível estimar tendências e possíveis implicações dessas nos sistemas de saúde, permitindo sua utilização para aferir necessidades de saúde atual e futura (Burstein et al, 2011).

Estatísticas nacionais de mortalidade apresentam ampla variação de coleta e qualidade em nível mundial. Enquanto em países industrializados são coletados rotineiramente, em outros são praticamente inexistentes, o que faz com que se estime que coletivamente esses dados estejam disponíveis para aproximadamente 30% da população mundial. Da mesma forma, a qualidade destes dados varia entre os países, com estudos relatando cerca de 90% de concordância entre os atestados de óbito e dados de patologia para diagnósticos nos Estados Unidos (Kircher et al, 1985). Para os países sem registro de óbito ou informações limitadas sobre a causa da morte, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) realiza a estimativa da região baseada em dados disponíveis do país ou região-específica. Em 2008, o número de casos de câncer diagnosticados foi de aproximadamente 12,7 milhões, com um número total de mortes por câncer de aproximadamente 7,6 milhões: 2,8 milhões em países desenvolvidos e 4,8 milhões em países de baixa e média renda, já com relação ao câncer de mama, ocorreram 1.383.523 casos novos com 458.367 mortes por este diagnóstico (Ferlay et al, 2010). Esses números devem crescer rapidamente devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial, bem como pela mudança do perfil de estilo de vida, anteriormente já citados.

Os registros de câncer de mama são realizados no Brasil pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) através do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) e o Registro Hospitalar de Câncer (RHC). Ambos atuam diretamente na vigilância epidemiológica do câncer no país. O RCBP produz informações que permitem descrever e monitorar o perfil da incidência, enquanto os RHCs reúnem informações que têm por finalidade a avaliação da qualidade da assistência prestada a pacientes atendidos em determinado hospital ou num conjunto de hospitais (INCAb, 2014); O RHC está vinculado a centros de assistência de Alta Complexidade em Oncologia no Sistema Único de Saúde (SUS) e o RCBP mais

restrito a capitais e/ou grandes cidades (INCAc, 2014). Os dados de mortalidade de câncer de mama são extraídos do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), o qual está disponível desde 1975 para notificação de todas as mortes do Brasil.

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de 61%. Dessa forma, no ano de 2012 o Brasil teve 13.746 mortes por câncer de mama, e um total acumulado de 124.773 no período de 10 anos (2002-2012), sendo quase sua totalidade em mulheres (123.545) (MS-INCA), o que faz o câncer de mama ser o tipo mais comum de neoplasia maligna entre as mulheres (excluindo-se câncer de pele não-melanoma), representando 20,8% do total (INCAd) e com uma estimativa de 57.120 novos casos para o ano de 2014 (INCAe). No Rio Grande do Sul, a taxa bruta de incidência anual por 100.000 mulheres é de 87,72 casos, sendo o segundo estado do país em incidência, atrás apenas do Rio de Janeiro com 96,47 casos por 100.000 habitantes (INCAf).

### **1.1.2 Patologia**

A maioria dos tumores malignos de mama surge a partir de elementos epiteliais e são classificados como carcinomas. O câncer de mama constitui-se em um grupo heterogêneo de lesões que diferem quanto à sua apresentação clínica, características radiográficas, características patológicas e comportamento biológico, mesmo assim estes distúrbios são frequentemente discutidos como uma única doença. Historicamente, a classificação de câncer de mama invasivo foi baseada na morfologia microscópica, sendo a classificação mais utilizada a da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tavassoli, 2003), baseada no padrão de crescimento e características citológicas das células tumorais invasivas.

O carcinoma ductal invasor ou infiltrante (CDI) é o tipo histológico mais comum de câncer de mama e corresponde a 70-80% dos casos, sendo este um diagnóstico de exclusão (ou seja, este tipo de tumor é definido como um tipo de câncer que não é classificado em nenhuma das outras categorias especiais de carcinoma invasivo, como lobular, tubular, mucinoso, medular, e outros tipos

especiais). Os tipos especiais de câncer compreendem cerca de 20% a 30% dos carcinomas invasivos restantes.

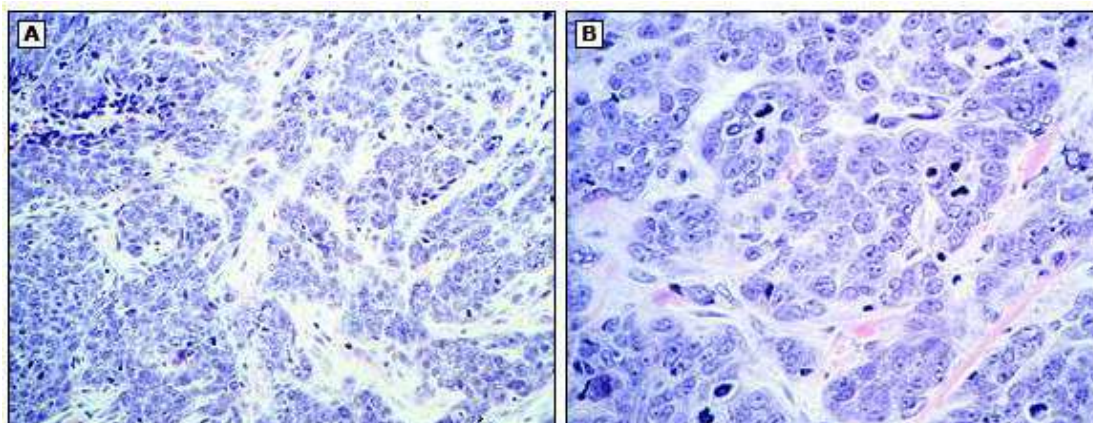
Os percentuais de frequência são estimados a partir de uma série de base populacional de 135.157 mulheres com câncer de mama referente a *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) pertencentes ao banco de dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (National Cancer Institute, NCI), entre 1992 e 2001 (Li et al, 2005):

1. Ductal invasivo – 76%
2. Lobular invasivo – 8%
3. Ductal / lobular – 7%
4. Mucinoso (colóide) – 2,4%
5. Tubular – 1,5%
6. Medular – 1,2%
7. Papilar – 1%

Reconhecendo que o CDI é histologicamente diversificado, com comportamento biológico variável, muitos pesquisadores têm tentado subclassificá-los com base em características microscópicas, sendo o método mais comumente utilizado baseado exclusivamente em características nucleares (classificação nuclear) ou em uma combinação de características arquitetônicas e nucleares ((Burstein et al, 2011). A aparência do núcleo de células tumorais é comparada com a de células epiteliais normais da mama, e assim são classificados como bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado.

Atualmente, o método mais utilizado de classificação baseia-se em uma graduação histológica que se utiliza da avaliação de (1) formação de túbulos, (2) pleomorfismo nuclear e (3) atividade mitótica, tendo sido proposta por Elston & Ellis (2002). Ela é feita com base em uma pontuação que vai de 1 a 3 para os quesitos de formação de túbulos (>75%, entre 10%-75% ou <10%), pleomorfismo nuclear (pequeno e uniforme, variação moderada em tamanho e forma ou pleomorfismo nuclear marcado) e atividade mitótica (por área de campo), sendo a soma das pontuações para estes três parâmetros o que determina o grau histológico: pontuações de 3-5 são designados grau I (bem diferenciado), de 6-7

são de grau II (moderadamente diferenciado), e de 8-9 são designados grau III (pouco diferenciados, figura 1). As classificações histológicas são periodicamente atualizadas, sendo a nova versão utilizada pela OMS publicada no ano de 2012 (Gobbi, 2012).



**Figura 1:** (A) Aumento de 100x de um carcinoma de mama pouco diferenciado mostrando que o tumor é composto de ninhos sólidos de células neoplásicas sem evidência de formação glandular. (B) Maior aumento (400x) mostrando marcada atipia nuclear em celular tumorais com considerável atividade mitótica.

Na avaliação patológica mais sumária, as lesões do CDI são tipicamente rígidas, cinzentas e irregulares, que invadem o tecido circunjascente de forma aleatória, criando uma forma característica irregular e espiculada. As células malignas, usualmente, induzem uma resposta fibrótica que infiltra o parênquima mamário, sendo essa reação em grande parte a responsável pelas massas palpáveis clinicamente, pela densidade radiológica e as características ultrassonográficas sólidas, típicas desses carcinomas (Kilbride & Newmann, 2010).

Os carcinomas lobulares invasores (CLI) constituem-se no segundo grupo mais freqüente (até 10% dos casos) e tem sua incidência aumentando mais rapidamente que os CDI, possivelmente em decorrência da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres menopáusicas, já que esse fator de risco é mais relacionado a esse tipo histológico (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). Histologicamente é possível diferenciar sem maiores dificuldades esses dois tipos de carcinoma, mas em alguns casos pode-se utilizar a imunohistoquímica (IHQ) para E-caderina, teste bastante acurado, mas na

maior parte das vezes desnecessário na prática clínica. A ocorrência associada com carcinoma lobular *in situ* (CLIS) está presente em até dois terços dos casos, ainda que o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) também possa acompanhar o CLI (Burstein et al, 2011). É importante notar que os CLI têm uma maior frequência de bilateralidade e multocentricidade que os CDI (Orvieto et al, 2008), acometendo mulheres em idade mais avançada e se apresentando como tumores de maior tamanho e melhor diferenciação (Pestalozzi et al, 2008). Estudos mais recentes têm sugerido que os desfechos de tratamento (pelo menos a curto prazo) parecem ser mais favoráveis para os CLI quando comparados aos CDI (Cristofanilli et al, 2005). Como grupo, os CLI tendem a metastatizar mais tardiamente e espalham-se por sítios menos usuais, como peritônio, meninges e trato gastrointestinal (Ferlicot et al, 2004). Existe uma forte associação entre mutações de caderina (gene *CDH1*) e CLI, sendo observado esse diagnóstico em 20 a 54% das mulheres provenientes de famílias com câncer gástrico difuso hereditário com mutações germinativas em *CDH1* (Berx et al, 1996).

Todos os outros subtipos (entre os quais as formas invasivas e metaplásicas do tipo micropapilar) representam menos de 5% dos casos, incluindo subtipos de tumor que ocorrem na mama, mas não são considerados como cânceres de mama típicos (*phyllodes* cistosarcoma, angiossarcoma e linfoma primário) (Dillon et al, 2009).

### **1.1.3 Fatores de Risco**

O câncer de mama está associado a diversos fatores de risco (idade, história familiar, exposição hormonal endógena e exógena, dieta, doença benigna da mama, história reprodutiva), no entanto, a maioria desses fatores implica em pequeno (a moderado) aumento no risco individual para qualquer mulher (Quadro 1). Estima-se que cerca de 50% de mulheres que desenvolvem câncer de mama não possuíam fator de risco identificável (além da idade e do sexo feminino), sendo muitas vezes a importância da idade como um fator de risco para o câncer de mama negligenciada, prova disso são os dados da Sociedade Americana de Câncer (American Cancer Society, ACS) que em 2010 publicou as estimativas daquele país, dando conta que ocorreram 18.640 cânceres de mama invasivos e

2.820 mortes por câncer de mama em mulheres abaixo dos 45 anos em comparação com 173.730 tumores e 37.350 mortes em mulheres com 45 anos ou mais (ACS, 2010).

**Quadro 1.** Magnitude de efeito de fatores de risco para câncer de mama

Risco relativo <2	Risco relativo 2–4	Risco relativo >4
Menarca precoce Menopausa tardia	Um parente de primeiro grau com câncer de mama	Mutação em <i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i>
Nuliparidade	Mutação em <i>CHEK2</i>	Hiperplasia atípica
Estrogenio e progesterona	Idade superior a 35 anos no primeiro filho	Exposição a radiação antes dos 30 anos
Terapia de reposição hormonal	Doença mamária proliferativa	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Álcool	Densidade mamária (mamográfica)	
Obesidade		

Adaptado de DeVita et al (Cancer: Principles & Practice of Oncology, 9th Edition), 2011.

### 1.1.3.1 Fatores familiares

História familiar de câncer de mama tem sido reconhecidamente um fator de risco para essa doença, apesar de que a maioria das mulheres diagnosticadas com câncer de mama não possuem um membro da família afetado; apenas 5% a 10% têm uma verdadeira predisposição hereditária ao câncer de mama, o que pode muitas vezes levar a uma superestimativa do risco, bem como a superindicação de testes genéticos. De forma geral, o risco de desenvolver câncer de mama aumenta de 1,5 a 3 vezes, se uma mulher teve a mãe ou uma irmã com câncer de mama.

Cabe frisar que a história familiar, no entanto, é um fator de risco heterogêneo, com diferentes implicações, dependendo do número de parentes com câncer de mama ou mesmo com outros tipos de tumores, o grau de parentesco, a idade no momento do diagnóstico, bem como o número de parentes não-afetados. Um exemplo disso é o caso de uma mulher cuja mãe foi diagnosticada com câncer de mama em idade avançada e que não tem outra



história familiar da doença, onde provavelmente (excluindo-se outros fatores) pode haver uma elevação mínima no risco de câncer de mama para ela. Em contraste, uma mulher que tem vários membros da família com diagnóstico de câncer de mama em idade jovem, o risco pode ser muito maior de desenvolver a doença (DeVita et al, 2011).

### **1.1.3.2 Predisposição hereditária para o câncer de mama**

Uma parcela dos cânceres de mama são decorrentes de fatores hereditários bem estabelecidos com risco de recorrência mendeliano, e representa de 5-10% do total de casos diagnosticados. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão entre as principais causas desses grupo etiológico, estando associadas com um aumento significativo do risco de carcinoma da mama e ovário. Estas mutações são herdadas de forma autossômica dominante, com penetrância incompleta. Como resultado, o risco de câncer de mama em mulheres portadoras de mutação germinativa em *BRCA1* é estimado em 65% (IC 95% = 44% a 78%) aos 70 anos e 39% (IC 95% = 18% -54%) para câncer de ovário (Antoniou et al, 2003). Outro estudo estimou o risco de câncer de mama e de ovário (aos 80 anos) em 90% e 24%, respectivamente (Risch et al, 2006). No entanto, uma meta-análise de dez estudos de indivíduos com uma mutação *BRCA1* relatou riscos cumulativos para câncer de mama aos 70 anos de idade em 57% e de câncer de ovário em 40% (Chen et al, 2006). Mutações germinativas em *BRCA2*, segundo Antoniou et al (2003), apresentam risco de câncer de mama e de ovário em torno de 45% (IC 95%= 33%-54%) e 11% (95 % CI= 4%-18%), respectivamente. Segundo outro estudo, o risco cumulativo de câncer mama e ovário, aos 70 anos, para indivíduos com uma mutação em *BRCA2*, é de 49% e 18%, respectivamente (Chen & Parmigiani, 2007). Além disso, tumores malignos em outros sítios também apresentam incidência aumentada em portadores de mutações nesses genes. Indivíduos com mutação patogênica em *BRCA1* possuem risco relativo de 120 para ocorrência de carcinoma de tubas uterinas (Medeiros et al, 2006). Além disso, o risco acumulado de desenvolver câncer peritoneal primário é de 3,9%-4,3% em 20 anos após ooforectomia (Casey, et al 2005; Finch et al 2006). O risco de câncer

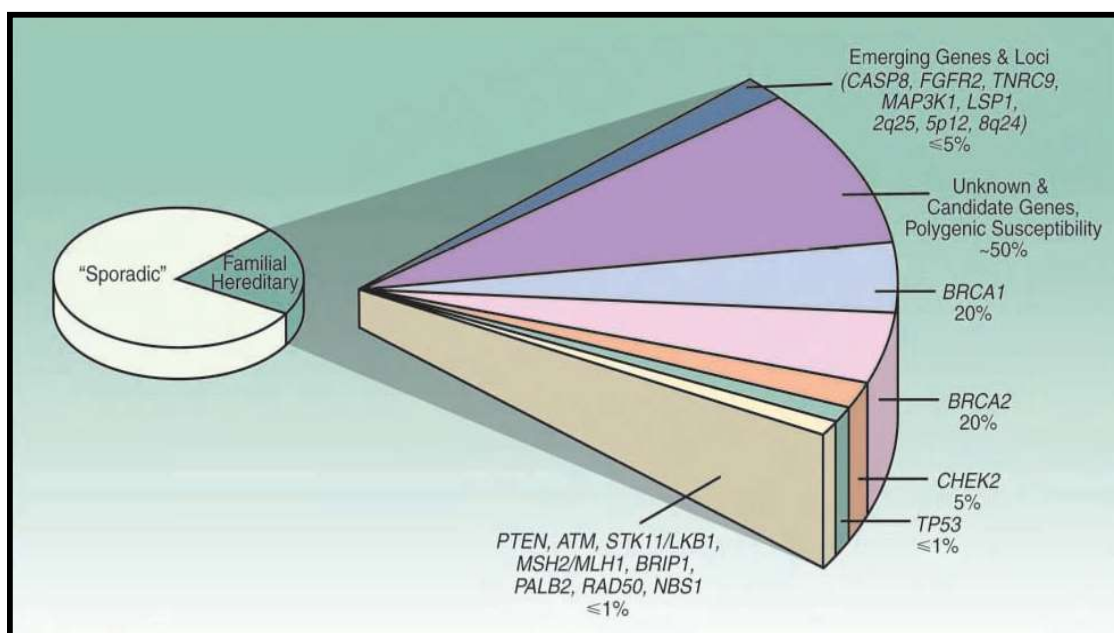
de próstata em homens heterozigotos para uma mutação no gene *BRCA1* é aumentado, com um risco relativo de aproximadamente 1,8 (Thompson & Easton, 2002), embora o risco possa variar significativamente, dependendo da localização da mutação de *BRCA1* (Cybulski et al, 2008).

Há um grande interesse no papel de fatores ambientais e de estilo de vida na modificação do risco de câncer entre portadores *BRCA1* ou *BRCA2*; atualmente, no entanto, os dados disponíveis são inconsistentes (Narod, 2006). Deve-se frisar que mulheres com histórico familiar significativo de câncer de mama (ou seja, dois ou mais tipos de câncer de mama com idade inferior a 50 anos, ou três ou mais casos de câncer de mama em qualquer idade), mas com teste negativo para mutações de *BRCA* tem aproximadamente um risco quatro vezes maior de câncer de mama, sendo indicado para as mesmas o seguimento dentro de um protocolo de alto risco (com intensificação das medidas de rastreamento) (Metcalfe et al, 2009).

As características histológicas de cânceres que surgem em mulheres com mutações *BRCA1* diferem daquelas que ocorrem esporadicamente, com uma maior incidência de características medulares e uma maior proporção de tumores grau 3. A proporção de tumores *BRCA1* que expressam receptores de estrogênio (RE) ou progesterona (RP) é menor do que a observada em tumores esporádicos, assim como a expressão de HER2 é infrequente (Lakhani et al, 2002). Sendo assim, os chamados tumores triplo-negativo são mais freqüentes nesse grupo de mulheres, sendo consistente com fenótipo de células basais. No entanto, ainda não está claro que o fenótipo de tumores com mutações *BRCA2* difira dos tumores esporádicos, embora alguns estudos tenham sugerido um excesso de carcinomas tubulares e lobulares (Lakhani et al, 2002).

Os cânceres de mama familiares (incluindo-se os hereditários anteriormente descritos) correspondem a cerca de 20% do total diagnosticado. Nesse grupo, vê-se uma agregação familiar forte, ainda que não sugestiva de um padrão de herança mendeliano clássico (autossômico dominante, por exemplo). Como já anteriormente discutido, os genes *BRCA1* e *BRCA2* são os dois principais genes de alta penetrância, estando associados à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, contabilizando quase metade do total desses casos.

Além disso, inúmeros genes de baixa penetrância vêm sendo descobertos por *Genome-wide association study* (GWAS), mesmo assim cerca da metade dos casos de câncer familiar/hereditário ainda permanecem com sua etiologia desconhecida, o que pode ser atribuído a genes ainda não descobertos ou mesmo a susceptibilidade poligênica (Figura 2).



**Figure 2.** Susceptibilidade genética ao câncer de mama. Adaptado de Olopade et al (2008).

### 1.1.3.3 Fatores hormonais

O desenvolvimento de câncer de mama em muitas mulheres parece estar relacionado a fatores hormonais, particularmente os de origem reprodutiva feminina, com diversos estudos epidemiológicos consistentemente identificando risco de câncer de mama associado ao aumento da exposição a estrogênios endógenos, bem como exógenos. Menarca precoce, nuliparidade, idade avançada da primeira gravidez levada ao termo e menopausa tardia aumentam os riscos de desenvolver câncer de mama. Em mulheres pós-menopáusicas, a obesidade e a TRH estão também positivamente correlacionadas com os níveis de estrogênios plasmáticos, sendo que estes últimos estão associados com risco aumentado de câncer de mama. No entanto, a maioria dos fatores de risco hormonal tem um risco relativo de 2 ou menos (Burstein et al, 2011).

A incidência específica de câncer de mama aumenta acentuadamente com a idade até a menopausa; após, embora a incidência continue aumentando, a taxa de crescimento diminui para aproximadamente um sexto do que a observada no período da pré-menopausa. Essa diminuição dramática da taxa de aumento na curva de incidência específica para a idade sugere que a atividade hormonal do ovário desempenhe um papel importante na etiologia. Além disso, há evidências substanciais de que a privação de estrogênio (por exemplo, via menopausa precoce iatrogênica) pode reduzir o risco de câncer de mama, demonstrando que mulheres na pré-menopausa que se submetem a ooforectomia sem reposição hormonal têm um risco significativamente reduzido de câncer de mama posteriormente (Trichopoulos, 1972). Além disso, mais recentemente através de estudos com mulheres com mutações *BRCA1* e *BRCA2* que realizaram ooforectomia precoce tem-se visto que a supressão hormonal decorrente também possui um efeito protetor substancial sobre o risco de câncer de mama nesta população (Kauff et al, 2002). A idade da menarca e do estabelecimento de ciclos ovulatórios regulares estão fortemente ligados ao risco de câncer de mama, já que parece haver uma diminuição de 20% no risco de câncer de mama para cada ano em que a menarca demora a ocorrer (Bernstein & Ross, 1993). A partir desses dados a respeito da menarca e menopausa, parece provável que a duração total de exposição aos estrógenos endógenos é um fator importante no risco de câncer de mama.

A relação entre a gravidez e o risco de câncer de mama parece ser mais complexa. Com base em estudos epidemiológicos, as mulheres cuja primeira gestação a termo ocorre após os 30 anos têm um aumento de duas a cinco vezes no risco de câncer de mama em comparação com as mulheres que têm uma primeira gravidez a termo antes dessa idade (Rosner et al, 1994). Além disso, mulheres nulíparas têm maior risco para o desenvolvimento de câncer de mama do que as mulheres multíparas, com um risco relativo de cerca de 1,4 (Chlebowski et al, 2003). O aborto, seja espontâneo ou induzido, não parece aumentar o risco de câncer de mama (Melbye et al, 1997). Amamentação, particularmente quando de longa duração, diminui o risco de diagnóstico de câncer de mama (Burstein et al, 2011). Os efeitos combinados da história

reprodutiva e amamentação podem ser os responsáveis pelas diferenças substanciais no risco de câncer de mama entre as nações desenvolvidas e em desenvolvimento.

O uso de combinado de estrogênio e progesterona na TRH também aumenta o risco de câncer de mama, quando comparado com o placebo, o uso de TRH foi associado com um risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama de 1,66 ( $p < 0,001$ ) e um risco relativo de morte por câncer de mama de 1,22 ( $p = 0,05$ ) (Beral, 2003). Sendo que os efeitos da TRH foram notados após um período relativamente curto de uso, com aumento no número esperado de mamografias anormais após um ano de TRH e persistindo ao longo de todo o estudo, com um aumento na incidência de câncer de mama observado após 2 anos. Além disso, os tumores que ocorreram em usuárias de TRH eram maiores e mais propensos metastatizar do que aqueles que ocorrem no grupo placebo (25,4% vs. 16%;  $p = 0,04$ ).

#### **1.1.3.4 Fatores dietéticos e de estilo de vida**

Há um interesse substancial em saber se fatores dietéticos ou de estilo de vida modificam o risco de câncer de mama, já que nesses casos intervenções preventivas podem ser realizadas de forma sistemática e populacionalmente.

Estudos observacionais sugerem que dietas com alto teor de gordura foram associados com maiores taxas de câncer de mama do que as dietas de baixa gordura. No entanto, uma meta-análise incluindo oito estudos prospectivos não identificou a associação entre a ingestão de gordura e aumento de risco de câncer de mama em mulheres (Alexander et al, 2010). Um estudo prospectivo mostrou uma redução na recorrência do câncer de mama no grupo intervenção (dieta com restrição de gordura); além disso, o risco de recorrência no grupo intervenção em comparação com o grupo controle foi de 0,76 (95% CI= 0,60-0,98,  $p = 0,034$ ) (Chlebowski et al, 2006). Pode haver um efeito protetor moderado de alto consumo de vegetais, mas os resultados para as frutas, fibras e consumo de carne não são conclusivos. Em contraste, parece haver uma associação positiva entre o álcool e o risco de câncer de mama, sendo esse que esse risco aumenta

linearmente em relação à quantidade de álcool consumida (Singletary & Gapstur, 2001).

A obesidade está associada tanto com um aumento do risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa quanto com aumento da mortalidade. Chlebowski et al (2003) verificou que mulheres com um índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 31,1 tiveram um risco 2,5 vezes maior de desenvolver câncer de mama do que aquelas com um IMC menor ou igual a 22,6. Além disso, sabe-se que o ganho de peso depois dos 18 anos de idade está associado com um aumento progressivo e substancial do risco de câncer de mama na pós-menopausa, mesmo na ausência de TRH (Willett et al, 2010).

#### **1.1.4 Diagnóstico**

A maioria dos cânceres de mama está associada a alterações mamográficas, já que apenas 10% deles são diagnosticados com base apenas em alterações do exame físico, enquanto a grande maioria (90%) são identificados por imagem (Smurt et al, 1993; Stomper et al, 2000). Em mulheres jovens os tumores podem se apresentar de tamanho maior, especialmente naquelas em idade anterior ao início do rastreamento, sendo importante nesses casos realizar imediatamente a mamografia (MMG) com vistas à avaliação inicial, independente da idade da paciente ou de avaliação anterior de rotina normal.

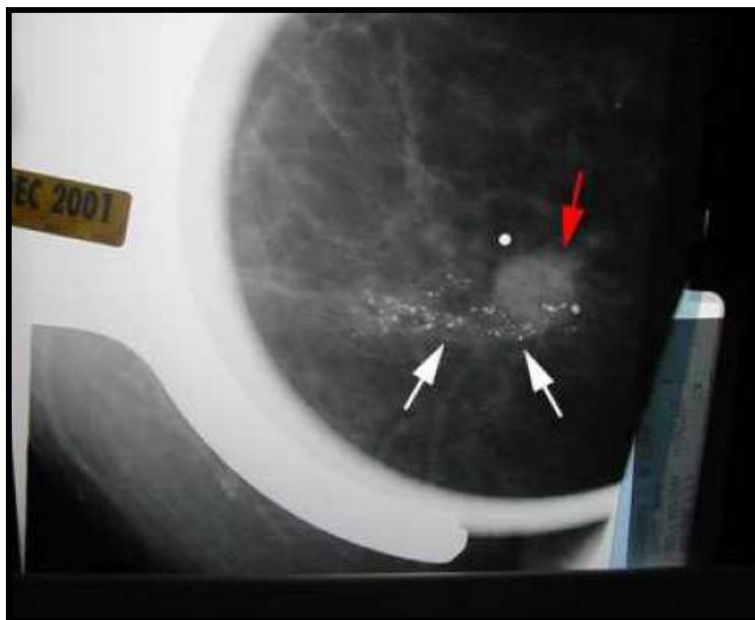
A mamografia diagnóstica (quando comparada a de rastreio) possui uma alta sensibilidade, mas baixa especificidade; em um estudo prospectivo em mulheres com sinais e sintomas sugestivos de câncer foram realizadas 41.427 mamografias das quais 15% (6.279) foram alteradas (Barlow et al, 2002). A sensibilidade e especificidade desse exame diminuem proporcionalmente com a densidade mamária e idade jovem das pacientes. Dessa forma o valor da MMG na detecção de câncer de mama em estágio inicial foi estabelecida há muito tempo.

Vários ensaios clínicos randomizados têm demonstrado que a triagem mamográfica reduz as taxas de mortalidade por câncer de mama de 15-22% (Humphrey et al, 2002), mas mesmo assim essa técnica tem as suas limitações, com taxas de falso-negativos que podem ser tão altas quanto 35% (Majid et al,

2003). Entre as possíveis causas desse fato estão o aumento da densidade mamária (que pode ocultar as lesões), posicionamento/técnica não-adequados, erros de avaliação, interpretação inadequada ou mesmo características muito tênues de malignidade (Majid et al, 2003). Embora a maioria dessas causas possa ser superada com formação e experiência adequada, o problema do aumento da densidade do parênquima mamário denso levanta a necessidade de outros métodos de imagem, como a ultrassonografia mamária (USG) para complementar a mamografia (Tan et al, 2014). A maioria das lesões se constitui de nódulos sólidos com ou sem distorção da arquitetura, ou microcalcificações. Os nódulos sólidos quando espiculados e irregulares representam carcinoma invasivos em cerca de 90% das vezes (Stomper, 2000). Já as microcalcificações são vistas em cerca de 60% dos cânceres de mama detectados mamograficamente (Figura 3).

A confirmação confiável do diagnóstico de câncer levantado por uma suspeita clínica ou mamográfica somente pode ser feita através da análise histológica. Em determinado momento, a alta sensibilidade da ressonância nuclear magnética (RNM) para detecção de câncer levantou a possibilidade de que esta técnica poderia substituir a biópsia na avaliação de lesões mamárias suspeitas. No entanto, em um estudo prospectivo multicêntrico, a sensibilidade da RNM foi de 88,1% (IC 95%: 84,6% -91,1%) e a especificidade foi de 67,7% (IC 95%: 62,7% -71,9%), indicando que uma RNM anormal não indica de forma confiável a presença de câncer, bem como também não exclui de forma confiável esse diagnóstico (Bluemke et al, 2004).

Dessa forma, a biópsia continua sendo a técnica padrão para o diagnóstico tanto de anormalidades palpáveis e quanto não-palpáveis. As técnicas de biópsia disponíveis para o diagnóstico de nódulos mamários palpáveis são punção aspirativa por agulha fina (PAAF), biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) ou biópsia excisional (Burstein et al, 2011).



**Figura 3.** Mamografia com compressão local mostrando uma massa espiculada de alta densidade (seta vermelha) com calcificações lineares heterogêneas com distribuição ductal (setas brancas), altamente sugestivas de CDIS.

Tanto a PAAF, quanto a *core biopsy* são procedimentos ambulatoriais. A PAAF é de fácil realização, mas requer citopatologista treinado para interpretação precisa do espécime, permitindo uma sensibilidade de 80% a 95%, com falso-positivos em menos do que 1% dos casos (Burstein et al, 2011). Resultados falso-negativos são vistos de 4% a 10% dos casos, sendo mais comuns quando da ocorrência de tumores fibróticos ou bem diferenciados (Hammond et al, 1987). Embora um diagnóstico por PAAF possa ser suficiente para prosseguir com o tratamento definitivo, este pode não distinguir de forma confiável um câncer invasivo de um carcinoma ductal *in situ*, levando eventualmente a medidas excessivas na terapêutica do último. A *core biopsy* tem muitas das vantagens da PAAF, pois fornece espécimes histológicos adequados para interpretação por patológica. Além disso, permite a análise IHC de receptores de estrogênio, de progesterona e proteína HER2, fazendo dessa técnica a melhor opção para pacientes que receberão terapia sistêmica pré-operatória (neoadjuvante). Resultados falso-negativos de erro de amostragem também podem ocorrer, sendo indicada a biópsia excisional quando não ocorrer concordância entre a *core biopsy* e os achados clínicos e de imagem (Burstein et al, 2011).



O diagnóstico de lesões não-palpáveis pode ser realizado através de biópsia guiada por imagem (ultrassom) ou excisão cirúrgica após a clipagem. No entanto, há pouco papel para PAAF no diagnóstico de lesões detectadas por exames de imagem de rastreamento (não-palpáveis), pela alta prevalência de lesões *in situ*. Em um estudo com 318 pacientes com anomalias mamográficas diagnosticados por biópsia entre 1997- 2001, a taxa de falso-negativo foi de 3,3%, entretanto, para radiologistas que já haviam feito mais de 15 biópsias, essa taxa foi de 0,6% (Pfarl et al, 2002).

### **1.1.5 Tratamento**

O tratamento do câncer de mama inclui uma série de modalidades terapêuticas distintas, que variam conforme o grau de gravidade da doença e que possuem uma série de particularidades, limitações e indicações próprias. Sumariamente, pode-se enumerar que incluem-se nesse grupo a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a hormonioterapia, e mais recentemente, a imunoterapia.

#### **1.1.5.1 Cirurgia**

Opções para o tratamento cirúrgico do tumor primário incluem a cirurgia conservadora da mama mais a terapia de radiação, além de mastectomia reconstrução ou mastectomia somente. O estadiamento cirúrgico da axila também deve ser realizado. A sobrevida com qualquer uma destas opções é equivalente, conforme descrito em estudos prospectivos randomizados (incluindo o *European Organization for Research and Treatment of Cancer's Trial* [EORTC-10801] (Fisher et al, 2002; van Dongen et al, 2000). A seleção da abordagem terapêutica local depende da localização e tamanho da lesão, da análise da mamografia, do tamanho da mama e da posição da paciente sobre preservar a mama. A presença de doença multifocal ou história de doença do colágeno são contra-indicações relativas à terapia conservadora da mama (Abrams et al, 1995). Todos os tipos histológicos de cânceres de mama invasivos podem ser tratado com cirurgia conservadora da mama, associado a radioterapia (Weiss et al, 1992). A taxa de recorrência local na mama com o tratamento conservador é baixa e varia

ligeiramente com a técnica cirúrgica utilizada (por exemplo, mastectomia, quadrantectomia, mastectomia segmentar, etc). No entanto, a necessidade de margens microscópicas completamente livres ainda é assunto discutível (Wazer et al, 1997; Solin et al, 1991). Os linfonodos axilares devem ser sempre estadiados para auxiliar na determinação do prognóstico e tratamento do caso. A biópsia de linfonodo sentinela (LS) é o procedimento padrão de estadiamento axilar inicial, realizado em mulheres com câncer de mama invasivo. O LS é definido como qualquer nódulo que recebe a drenagem linfática diretamente a partir do tumor primário; portanto, podendo ocorrer muitas vezes mais de um LS. Estudos têm mostrado que a injeção de colóide com tecnécio com enxofre marcado, corante azul patente ou ambos, para pesquisa da subsequente eliminação destes compostos resulta na identificação do LS em 92% a 98% dos pacientes (Rubio et al, 1998; Kern, 1999). Além disso, trabalhos tem demonstrado que existe uma concordância de 97,5% a 100% entre a biópsia do LS e esvaziamento axilar completo (Veronesi et al, 1997; Albertini et al, 1996; Krag et al, 1998). Um ensaio clínico de fase III randomizado, multicêntrico, com 5611 pacientes, aleatoriamente designados para LS mais esvaziamento axilar ou LS somente (com esvaziamento axilar quando LS positivo), não identificou diferença estatisticamente significativa na sobrevida geral, sobrevida livre de doença e controle regional (Krag et al, 2010).

Para pacientes que necessitem de esvaziamento axilar, o procedimento padrão é a dissecação apenas em nível I e II, removendo-se assim um número satisfatório de linfonodos para avaliação (isto é, pelo menos, 6-10), buscando a redução da morbidade do procedimento. Vários grupos têm tentado definir uma população de mulheres nas quais a probabilidade de metástase linfonodal é baixa o suficiente para evitar a biópsia de linfonodo axilar, sendo que em um trabalho a prevalência de linfonodos positivos em pacientes com tumores T1a variou de 9% a 16% (Rivadeneira et al, 2000). Como o estadiamento dos linfonodos axilares continua a ser um importante preditor de desfechos em pacientes com câncer de mama, as evidências disponíveis ainda são insuficientes para recomendar que esse estadiamento possa ser omitido na maioria das pacientes com câncer de mama invasivo.

### 1.1.5.2 Quimioterapia

Existem diversos regimes de quimioterapia que são padrões para o tratamento adjuvante do carcinoma da mama operável, os mesmo encontram-se descritos no Quadro 2. Até o momento, não há nenhuma evidência favorecendo qualquer regime como superior a outro, sendo assim, qualquer um destes regimes é aceitável, e a sua escolha é feita com base nas particularidades de cada caso (Breast Cancer PDQ, 2015).

Alguns dos dados mais importantes sobre o benefício da quimioterapia adjuvante vieram do estudo EBCTCG, que se reúne a cada cinco anos para rever os dados de estudos globais sobre o câncer de mama (EBCTCG, 2005). Essas análises incluíram 28.764 mulheres submetidas à quimioterapia adjuvante que participaram em 60 ensaios comparadas a pacientes sem quimioterapia, 14.470 mulheres submetidas à quimioterapia em esquema ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluoracil *versus* quimioterapia contendo antraciclina e 6.125 mulheres em 11 ensaios comparando esquemas de longa e curta duração. Para as mulheres com idade inferior a 50 anos, a poliquimioterapia reduziu o risco anual de recidiva da doença e morte por câncer de mama em 37% e 30%, respectivamente. Isso se traduziu em uma melhoria absoluta de 10% na sobrevida em 15 anos (HR, 42% vs. 32%). Para as mulheres de 50 a 69 anos, o risco anual de recaída ou morte por câncer de mama foi reduzida em 19% e 12%, respectivamente. Isso se traduziu em um ganho absoluto de 3% na sobrevida em 15 anos (HR, 50% vs. 47%). O ganho absoluto de sobrevida para a poliquimioterapia *versus* nenhum tratamento adjuvante em mulheres com menos de 50 anos era duas vezes maior em 15 anos, assim como foi em 5 anos (10% vs. 4,7%), sendo que o principal efeito sobre a recorrência da doença foi visto nos primeiros 5 anos (EBCTCG, 2005). A redução cumulativa de mortalidade em 15 anos (a partir de 6 meses) de regimes à base de antraciclina (por exemplo: fluorouracil, doxorubicina, ciclofosfamida [FAC] ou fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida [FEC]) foi de 38% em mulheres abaixo dos 50 anos, e de 20% no grupo etário de 50 a 60 anos.

**Quadro 2.** Regimes de quimioterapia adjuvante padrão para estádios I, II, IIIA e IIIC operável em câncer de mama com *HER2/neu* negativo.

Regime	Nº de ciclos e duração (d)	Cytoxan (mg/m <sup>2</sup> )	5-FU (mg/m <sup>2</sup> )	Doxorubicina (mg/m <sup>2</sup> )	Paclitaxel/ Docetaxel (mg/m <sup>2</sup> )
CAF	6 × 21	500, IV d 1	500, IV d 1	50, IV d 1	
AC	4 × 21	600, IV d 1	—	60, IV d 1	
AC-T Dose-densa	4 (AC), 4 (T) × 14	600, IV d 1	—	60, IV d 1	P: 175, IV d 1
TAC	6 × 21	500, IV d 1	—	50, IV d 1	D: 75, IV d 1
TC	4 × 21	600, IV d 1	—		D: 75, IV d 1

AC= ciclofosfamida, doxorubicina; AC-T= ciclofosfamida, doxorubicina, taxol; CAF= ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracil; d= dia; D=docetaxel; IV= intravenoso; P= paclitaxel; T= taxol; TAC= docetaxel, doxorubicina and ciclofosfamida; TC= docetaxel e ciclofosfamida; 5-FU= 5-fluorouracil.

Essa meta-análise também mostrou que a redução do risco de recidiva foi semelhante na presença ou ausência de tamoxifeno, independentemente da sua idade (abaixo dos 50 anos vs. idade entre 50-69 anos). Poucas mulheres acima de 70 anos foram estudadas e as conclusões específicas para este grupo ainda não podem ser feitas. É importante ressaltar que esses dados foram obtidos a partir de ensaios clínicos em que os pacientes não foram selecionados para a terapia adjuvante de acordo com o *status* imunohistoquímico (presença ou ausência de RE) e que foram iniciados antes do advento dos taxanos, do esquema de dose-densa ou do trastuzumabe (EBCTCG, 2005), não podendo refletir os resultados desses novos tratamentos desenvolvidos. Resultados de estudos individuais de uma forma geral estão de acordo aos encontrados nas conclusões da meta-análise descrita. O estudo NSABP-B-13 demonstrou um benefício para a quimioterapia com metotrexato sequencial e 5-FU *versus* cirurgia sozinha em pacientes com linfonodos negativos e tumores RE-negativos (Fischer et al, 1990; Fischer et al, 2004; Mansour et al, 1998).

### 1.1.5.3 Radioterapia

A radioterapia (como parte do tratamento local conservador da mama) consiste na aplicação de feixe externo pós-operatório em toda a mama com doses totais de 45-50Gy, fracionadas em doses diárias de 1,8-2,0Gy ao longo de um período de 5 semanas, esquemas hipofracionamento mais curto também

obtiveram resultados comparáveis (Owen et al, 2006). Dois estudos randomizados realizados na Europa têm mostrado que o uso de *boosts* de 10 Gy a 16 Gy reduz o risco de recorrência local de 4,6% para 3,6% em 3 anos ( $p=0,044$ ) (Romestaing et al, 1997) e de 7,3% para 4,3% em 5 anos ( $p<0,001$ ) (Bartelink et al, 2001). A radioterapia é empregada regularmente após a cirurgia conservadora da mama, podendo ser também indicada para pacientes pós-mastectomia, com o objetivo principal (no contexto adjuvante) erradicar a doença residual e assim reduzir a recorrência local (Clarke et al, 2005).

Para as mulheres que são tratadas com cirurgia conservadora da mama sem radioterapia, o risco de recorrência na mama conservada é substancial (mais de 20%), mesmo quando os linfonodos axilares são negativos. Assim, é recomendada a radioterapia em praticamente toda a mama pós-cirurgia conservadora (Eifel et al, 2001). Apesar de todos os estudos que avaliam o papel da radioterapia no tratamento conservador mostrarem reduções altamente significativas na taxa de recorrência local, nenhum trabalho ainda demonstrou uma redução estatisticamente significativa na mortalidade. No entanto, uma meta-análise incluindo 17 ensaios clínicos realizada pelo EBCTCG e que incluiu mais de 10.000 mulheres com câncer de mama inicial embasa a indicação de radioterapia de toda a mama após cirurgia conservadora (Darby et al, 2011), já que esse procedimento resulta em uma redução significativa no risco de recorrência de 10 anos em comparação com a cirurgia conservadora da mama sozinha (19% vs. 35%, respectivamente; risco relativo (RR), 0,52; 95% IC: 0,48-0,56), bem como uma redução significativa no risco de morte por câncer de mama (21% vs. 25% em 15 anos; RR, 0,82; 95% IC: 0,75-0,90) (Darby et al, 2011). Radioterapia adjuvante de parede torácica e de linfonodos regionais adjuvante tem sido tradicionalmente indicada a pacientes selecionadas em que se considerada um alto risco para falha local-regional após mastectomia, já que a radioterapia pode reduzir a recorrência loco-regional neste grupo, mesmo entre os pacientes que receberam quimioterapia adjuvante (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2000). Os pacientes com maior risco de recorrência local incluem aqueles com quatro ou mais gânglios axilares positivos, extensão linfonodal extracapsular grosseiramente evidente, grandes tumores primários e

margens muito estreitas ou positivas profundas de ressecção do tumor primário (Ragaz et al, 1997; Overgaard et al, 1997). Pacientes com 1-3 linfonodos comprometidos sem nenhum dos fatores de risco previamente listados são consideradas de baixo risco de recorrência local e o valor do uso rotineiro de radioterapia adjuvante neste cenário tem sido pouco claro.

#### **1.1.5.4 Hormonioterapia**

Atualmente, a definição de indicação de hormonioterapia no câncer de mama passa pela identificação do *status* tumoral em relação aos receptores hormonais (de estrogênio e progesterona), usualmente por método imunohistoquímico, já que essa técnica parece confiável o suficiente (quando realizada em laboratórios de qualidade com pessoal experiente) na predição de resposta a terapia endócrina adjuvante (Harvey et al, 1999).

Uma meta-análise publicada no ano de 2005, incluindo 80.273 mulheres provenientes de 71 ensaios clínicos sobre tamoxifeno adjuvante encontrou benefício de uso de tamoxifeno restrito àquelas com RE positivos ou com esse status desconhecido, com reduções absolutas de recorrência e mortalidade após 15 anos, quando do uso por 5 anos, de 12% e 9%, respectivamente (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). A alocação de mulheres em um protocolo de uso de tamoxifeno por 5 anos reduz a taxa anual de morte por câncer de mama em 31%, independentemente do uso de quimioterapia, da idade (<50 anos, 50-69 anos, ≥70 anos), da positividade para receptores de progesterona ou de outras características tumorais. Esse mesmo trabalho também confirmou o benefício de tamoxifeno adjuvante em mulheres na pré-menopausa com RE positivos, com grau de benefício em mulheres com menos de 50 anos, bastante semelhantes ao obtido por mulheres mais velhas. Além disso, as reduções proporcionais, tanto na recorrência e mortalidade associadas ao uso de tamoxifeno foram semelhantes em mulheres com câncer de mama com linfonodos negativos ou positivos, apesar de uma melhora absoluta na sobrevivência em 10 anos ser maior no último grupo (5,3% vs. 12,5%, com 5 anos de uso) (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo IBCSG-13-93 com 1.246 mulheres

com doença em estágio II, onde apenas com RE positivos se beneficiaram do uso de tamoxifeno (Colleoni et al, 2006).

Ainda existem controvérsias quanto a duração ideal da terapia com tamoxifeno em mulheres pré-menopáusicas, se 5 anos ou 10 anos. O estudo ATLAS (*Adjuvant Tamoxifen Longer Against Shorter*) que aleatoriamente alocou 12.894 mulheres com câncer de mama em estágio inicial entre 1996 e 2005, revelou que 10 anos de tamoxifeno reduz o risco de recorrência do câncer de mama (617 vs. 711 recorrências, 10 vs. 5 anos, respectivamente;  $p=0,002$ ), reduz a mortalidade por câncer de mama (331 vs. 397 mortes,  $p=0,01$ ) e reduz a mortalidade global (639 vs. 722 mortes,  $p=0,01$ ) (Davies et al, 2013). No entanto, a terapia estendida por 10 anos, quando comparada ao uso por 5 anos, aumenta os riscos associados ao tamoxifeno, a saber:

- ◆ Embolia pulmonar: RR=1,87 (IC 95%: 1,13-3,07,  $p=0,01$ );
- ◆ Acidente vascular cerebral: RR=1,06 (IC 95%: 0,83-1,36);
- ◆ Câncer de endométrio: RR=1,74 (IC 95%: 1,30-2,34,  $p=0,0002$ ).

A partir de estudos que demonstraram superioridade dos IA sobre o tamoxifeno com relação à sobrevida livre de doença (*disease-free survival*, DFS), essa se tornou a terapia adjuvante de primeira linha para mulheres na pós-menopausa. No entanto, a ausência de evidências de vantagens desses fármacos no que diz respeito à sobrevida total, faz com que o tamoxifeno continue a ser uma alternativa razoável. Maiores detalhamentos sobre as indicações, bem como farmacologia e efeitos adversos dos IA serão abordados subsequentemente.

#### **1.1.5.5 Outras opções terapêuticas**

O papel dos bisfosfonatos como parte da terapia adjuvante para o câncer de mama em estágio precoce é incerto. O estudo ABCSG-12 (NCT00295646) que incluiu 1.803 pacientes na pré-menopausa com tumores de mama RE positivos que foram submetidas à supressão ovariana com goserelina e tamoxifeno, ou goserelina e anastrozol. Esses pacientes, em seguida, foram submetidos a nova randomização para receber o ácido zoledrônico (4 mg IV, a cada 6 meses) ou não (placebo). Não houve diferença significativa na DFS entre o grupo anastrozol e tamoxifeno. No entanto, a adição de ácido zoledrônico quando comparado com a

sua não utilização, resultou em redução relativa de 36% no risco de progressão da doença (HR=0,64; p=0,01), apesar de não reduzir a mortalidade (Gnant et al, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos em outro ensaio clínico (NCT00171340), na qual 1065 mulheres na pós-menopausa receberam letrozol e foram distribuídos aleatoriamente para receber o ácido zoledrónico (4 mg IV, a cada 6 meses) ou somente após início de perda de massa óssea ou fraturas. Administração imediata do ácido zoledrónico resultou em uma melhoria de 34% na DFS (HR=0,66; 95% IC: 0,44-0,97, p=0,035), mas não afetou sobrevida total (*overall survival*, OS) (Coleman et al, 2011). Com base nos resultados conflitantes desses estudos, o papel exato de bisfosfonatos na terapia adjuvante para o câncer de mama ainda é controversa.

Vários ensaios clínicos fase III têm abordado o papel do anticorpo anti-HER2/neu, trastuzumabe (Herceptin®), como terapia adjuvante para pacientes com câncer apresentando superexpressão de HER2. No estudo *HERceptin Adjuvant* (HERA) com 5.090 pacientes, o trastuzumabe foi dado a cada 3 semanas dentro do prazo de 7 semanas do término da terapia primária, que incluíam na maioria das pacientes, um regime de quimioterapia contendo antraciclina (pré- ou pós-operatória) e/ou radioterapia loco-regional. As pacientes que foram tratadas com um ano de trastuzumabe mostraram risco 46% menor de recidiva (HR=0,54; 95% IC: 0,43-0,67; P <0,001), o que corresponde a um benefício absoluto na DFS de 8,4% em 2 anos (IC 95%: 2,1-14,8). Os resultados atualizados no seguimento de 23,5 meses mostrou um HR não-ajustado para o risco de morte com trastuzumabe em comparação ao placebo de 0,66 (95% CI: 0,47-0,91; p=0,0115), o que corresponde a um benefício absoluto na OS de 2,7% (Piccart-Gebhart et al, 2005; Smith et al, 2007). Depois de um período de acompanhamento médio de 8 anos, foram analisados os resultados da comparação de um ano contra 2 anos de trastuzumabe e não foi encontrada na DFS entre os grupos (HR=0,99; 95% IC: 0,85-1,14; p=0,86) (Goldhirsch et al, 2013). O efeito secundário mais temido é a cardiomiopatia, que além de infrequente (<5% dos casos), é geralmente reversível. O trastuzumabe deve ser iniciado somente após a última administração de antraciclina, concomitantemente



ou sequencialmente aos taxanos (se esses forem utilizados) por um período de um ano.

### **1.1.6 Prognóstico**

Primeiramente, é importante que as definições de fatores prognósticos e preditivos sejam bem estabelecidas. Um fator prognóstico é demonstrado através de separação estatisticamente (e clinicamente) significativa das curvas de desfecho baseadas na presença ou ausência do fator, já um fator preditivo é uma medida que prevê a resposta ou a falta de resposta a um tratamento específico, ou seja, é interação entre um fator e um tratamento. Na prática, muitos fatores são igualmente prognósticos e preditivos (Humphrey et al, 2002).

O sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) é baseado fatores prognósticos clínicos e patológicos estabelecidos. A extensão do comprometimento axilar no câncer de mama é o fator prognóstico mais estabelecido e confiável para a doença metastática subsequente e sobrevivência. Isto não é surpreendente, uma vez que reflete evidência do potencial metastático real. O envolvimento ganglionar axilar tem sido geralmente estratificado pelo número de nódulos linfáticos positivos (por exemplo: 0, 1-3, 4-9 e 10 ou mais), embora as análises mais recentes tenham enfatizado na percentagem de nódulos linfáticos positivos, dada a variabilidade da extensão da dissecação axilar entre os cirurgiões (Chang et al, 2010). O tamanho do tumor e sua gradação histológica também têm sido estabelecidos como de importante significância prognóstica. O grau histológico é melhor determinado por uma metodologia estabelecida, como o sistema de Nottingham. Uma crítica ao uso do grau histológico tem sido a falta de concordância entre os patologistas; no entanto, isso vem sendo melhorado através da padronização da metodologia estabelecida (Burstein et al, 2011).

Atualmente, a expressão tumoral dos receptores de estrogênio e progesterona são os fatores preditivos mais importantes e úteis, isso porque mulheres em que ocorre a negatividade desses receptores (RE e/ou RP) não se beneficiam da hormonioterapia, quer no contexto metastático ou adjuvante. Os ensaios existentes atualmente para RE e RP podem ser realizados por técnica de

IHQ, que têm entre as suas principais vantagens poder ser realizada em tecidos já blocos de parafina (o que faz com que o tamanho tumoral não seja um fator limitante importante), além de permitir a correlação com características histológicas (o que elimina o risco de ter sido feito em tecido não-tumoral). No entanto, é necessário que os laboratórios tenham aderência às técnicas descritas com rigor. Relatório recente da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology, ASCO*) e do Colégio Americano de Patologia destacou a importância da alta qualidade dos testes de IHQ para RE e RP como uma peça central no cuidado de pacientes com câncer de mama (McShane et al, 2005). Sendo o *status* RE/RP fundamental para orientações de manejo atuais, alguns centros tendem a repetir o ensaio se a determinação inicial foi RE-negativo ou RP-negativo (particularmente se houver qualquer razão para questionar o resultado, como em um paciente com câncer de baixo grau). Embora existam dados indicando que pacientes cujos tumores têm até mesmo apenas 1% de células positivamente marcadas para receptores hormonais podem se beneficiar da terapia hormonal adjuvante, ainda é controverso se os laboratórios podem informar de forma confiável o percentual de RE e RP positivos (Hammond et al, 2010).

Dessa forma, utilizando o tamanho e grau histológico tumoral, dados imunohistoquímicos sobre receptores hormonais e o número de gânglios axilares envolvidos, é possível estimar o prognóstico de um paciente (Schnitt, 2006). Um desses serviços *on-line* que é amplamente utilizado e foi validado é *Adjuvant Online* ([www.adjuvantonline.com](http://www.adjuvantonline.com)) (Olivotto et al, 2005).

A idade da paciente também é indubitavelmente um importante fator prognóstico, uma vez que pacientes muito jovens com câncer de mama (35 anos ou menos) apresentam um pior prognóstico do que as pacientes de mais idade, já que os tipos de câncer nessas pacientes tendem a ser de maior grau, menos frequentemente RE/RP-positivo e mais propensas a ter invasão linfovascular (Nixon et al, 1994). No entanto, ainda não está claro se essas diferenças de características patológicas explicam plenamente o pior prognóstico nessas pacientes jovens (Kollias et al, 1997).

Aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama apresentam amplificação do gene HER2/neu, o que resulta em super-expressão desta glicoproteína, sendo que em apenas 5% dos casos pode ocorrer a super-expressão sem amplificação do gene. Já que na maioria das vezes a amplificação e a expressão de HER2 são altamente correlacionadas, este é o principal fator preditivo para determinação do benefício do uso de trastuzumabe (Herceptin®), já que está fortemente associado com maior grau de diferenciação tumoral, ausência de positividade para receptores hormonais, níveis mais elevados de proliferação tumoral, resultando em pior prognóstico. Existem também algumas evidências que sugerem que o *status* de HER2 é preditivo para benefícios de quimioterapia baseada em antraciclinas (Piccart-Gebhart, 2006). A análise de HER2 pode ser realizada por IHC ou hibridação *in situ* fluorescente (FISH), mas de forma semelhante aos receptores hormonais, é fundamental que os laboratórios adotem medidas rigorosas de controle de qualidade, já que é um teste definidor de tratamento (Wolff et al, 2007).

O envolvimento de espaços linfovascular está associado a uma maior probabilidade de metástases linfáticas e é um fator prognóstico adverso independente, para pacientes com linfonodos negativos ou positivos. No entanto, critérios patológicos rígidos são necessários para que esse fator possa ser confiável, isso inclui a garantia de que as células cancerosas visualizadas estejam em área delimitada por endotélio e apresentem distância mínima do núcleo tumoral principal, o que permite distinguir a invasão linfovascular de algum artefato de refração; sendo que muitas vezes, em alguns centros, são utilizadas colorações IHC para células endoteliais (Braun et al, 2005).

## 1.2 Inibidores da Aromatase

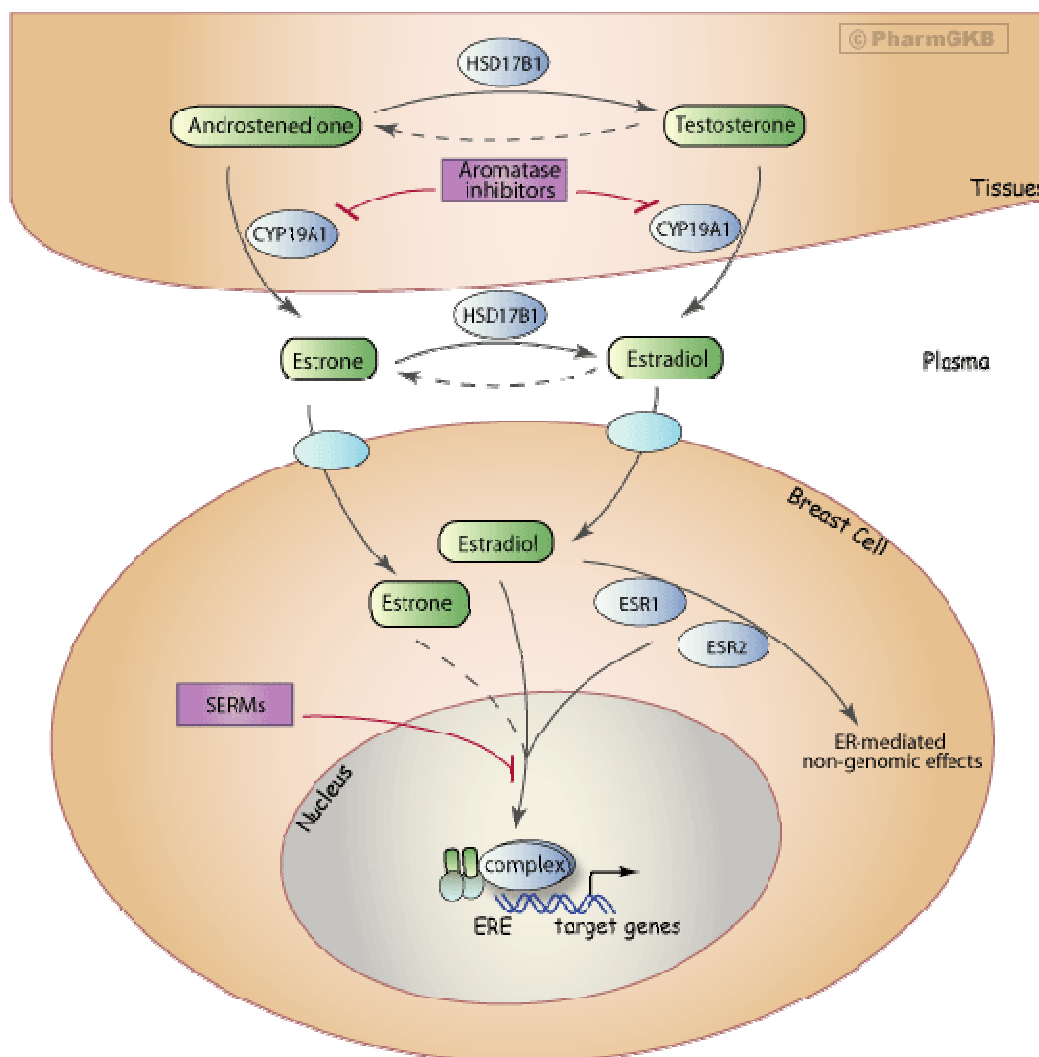
A enzima aromatase é um produto do gene *CYP19A1*, que é altamente expresso na placenta e nas células granulosas dos folículos ovarianos, sendo que essa expressão depende da estimulação cíclica da gonadotropina. Essa enzima também pode estar presente em tecidos não-glandulares (em menor grau), como fígado, tecido muscular, tecido adiposo subcutâneo, cérebro e tecido mamário (normal ou tumoral) (Smith & Dowsett, 2003).

A aromatase é responsável pela conversão de testosterona e androstenediona em estrógenos, estrona (E1) e estradiol (E2), respectivamente. Em mulheres pós-menopáusicas, essa conversão se dá principalmente em tecidos periféricos, enquanto que nas mulheres pré-menopáusicas isso ocorre primariamente nos ovários (Figura 4).

Os IA são uma nova classe de fármacos que inibem a função da enzima aromatase, sendo que em mulheres pós-menopáusicas podem suprimir toda a sua atividade periférica, levando a um estado de deprivação estrogênica profundo. Essa é uma estratégia que diferencia os IAs do tamaxifeno (pertencente ao grupo dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio ou “*selective estrogen receptors modulators*”, SERMs).

Com base no momento em que foram desenvolvidos os IA, eles são classificados em primeira, segunda ou terceira geração. Além disso, também são subdivididos em tipo 1 (inativadores da aromatase esteróides) e tipo 2 (inibidores da aromatase não-esteróides). Os IA do tipo 1 se ligam de forma irreversível a enzima, por isso são chamados de inativadores, diferentemente dos tipo 2 que se ligam de forma reversível ao grupo heme da enzima aromatase. Entre os inibidores da aromatase de primeira geração está o aminoglutetimide (Cytadren®), desenvolvido inicialmente como anticonvulsivante para uso concomitante com hidrocortisona, mas devido ao seu perfil bastante tóxico teve um grande declínio no seu uso com o surgimento de IA mais novos. Entre os IA de segunda geração está o formestane (Lentaron®, inativador tipo 1), o fadrozole (imidazólico tipo 2) e a rogletimida (inibidor tipo 2). O formestane foi o primeiro IAs amplamente usado no tratamento do câncer de mama (Goss et al, 1986), sendo que seu uso era principalmente parenteral (através de injeções intramusculares

de depósito). Os IA de terceira geração foram desenvolvidos na década de 90, e nos quais se incluem o exemestane (esteróide de tipo 1), o anastrozol (não-esteróide de tipo 2) e o letrozol (não-esteróide de tipo 2); sendo esses os IAs mais comumente usados no tratamento do câncer de mama tanto em fases iniciais como avançadas (Chabner et al, 2006), que serão melhor detalhados a seguir.



**Figura 4:** Resumo das vias bioquímicas de estrogênios e locais de ação de fármacos antiestrogênicos. Adaptado de PharmaGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)

## 1.2.1 Características farmacológicas dos inibidores da aromatase

### 1.2.1.1 Anastrozol

O anastrozol, nome comercial Arimidex<sup>®</sup>, é um inibidor não-esteróide competitivo da aromatase, sendo um potente IA triazólico (Figura 5). Assim como o letrozol, o anastrozol liga-se competitivamente e especificamente com o grupo heme do CYP19. A administração de 1mg ou 10mg por 280 dias reduz a aromatização corporal em 96,7 e 98,1% respectivamente (Chabner et al, 2006). Clinicamente, o anastrozol não tem ação sobre as adrenais (síntese de gluco- e mineralocorticóides) em mulheres pós-menopáusicas, assim como não impacta na ação do ACTH ou nas concentrações de LH ou FSH (Wellington & Faulds, 2002).

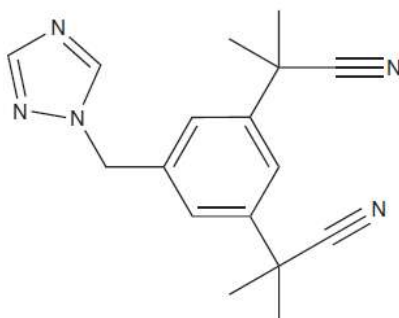
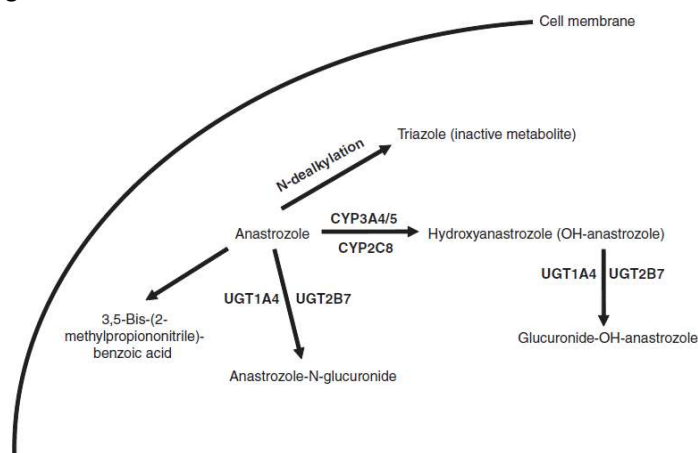


Figura 5. Estrutura química do anastrozol.

O anastrozol é rapidamente absorvido pela ingestão oral, com um pico sérico em 2 horas. Doses repetidas aumentam os níveis sérico progressivamente, com um platô atingido após 7 dias. Esse fármaco é metabolizado por meio de três processos bioquímicos distintos: desalquilação, hidroxilação e glicuronidação, sendo que menos de 10% da medicação é excretada na forma não-metabolizada. A hidroxilação de fase I ocorre principalmente no fígado com a conversão para hidroxianastrozole, sendo a molécula também desalquilada pela CYP3A4 e menos predominantemente por CYP3A5 e CYP2C8. O metabolismo de fase II do anastrozol é por meio da glicuronidação realizada por UGT1A4 e, menos frequentemente, por UGT2B7 e UGT1A3 para produzir glucuronídeo-OH-anastrozol (Figura 6) (Kamdem et al, 2010). Um estudo *in vivo* relatou que o anastrozol tem uma ampla variação inter-individual no seu metabolismo (Ingle et al, 2010). Já experiências *in vitro* mostraram que o anastrozol pode sofrer

glucuronidação direta de fase II gerando anastrozol-N-glucuronídeo em microsomos hepáticos humanos (Lazarus et al, 2010), sugerindo que os polimorfismos em *UGT1A4* podem desempenhar um papel importante no metabolismo de anastrozol. Wiener et al (2004) identificaram que a enzima *UGT1A4* tem duas variantes genéticas, P24T (*UGT1A4\*2*) e L48V (*UGT1A4\*3*), ambas associadas com atividade alterada glucuronidação *in vitro*. No entanto, esta atividade catalítica alterada parece ser dependente do substrato (Ehmer et al, 2004). Os estudos clínicos com amostras maiores são necessários para avaliar o efeito destas duas variantes genéticas e sua correlação com glucuronidação e metabolismo em geral do anastrozol *in vivo*.



**Figura 6.** Metabolismo anastrozol: o anastrozol pode sofrer Fase II direta glicuronidação por *UGT1A4* e *UGT2B7* para formar anastrozol-N-glicuronídeo. No entanto, a principal via de metabolismo é através do *CYP3A4/5* e *CYP2C8* seguido por glicuronidação via *UGT1A4* e *UGT2B7*. *UGT1A4\*2* e *UGT1A4\*3* são variantes genéticas que poderiam desempenhar um papel na atividade glicuronidação alterada do anastrozol. Adaptado de Turkistani & Marsh, 2012.

### 1.2.1.2 Letrozol

Letrozol (figura 7), nome comercial Femara®, é um inibidor competitivo não-esteróide da aromatase, que reduz totalmente a aromatização corporal e de forma significativa dentro da massa tumoral. Como o anastrozol, não interfere no metabolismo adrenal ou tireoideo, assim como de outros hormônios. O letrozol reduz de forma significativa (e superior ao tamoxifeno) marcadores de proliferação celular, em tumores que expressam receptores de estrogênio e HER2/neu (Chabner et al, 2006). O letrozol é rapidamente absorvido após administração oral, com pico máximo em 1 hora, e uma biodisponibilidade de 99,9%. O letrozol é excretado principalmente por via renal, como um metabólito carbinol-inativo,

sendo o tempo de meia-vida para excreção da medicação de 40-42 horas (Geissler et al, 2003).

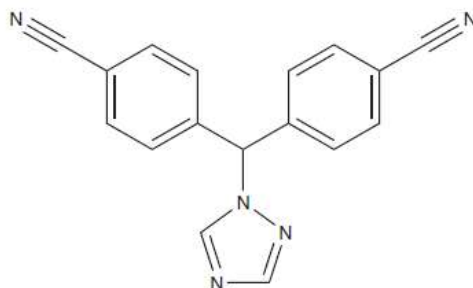
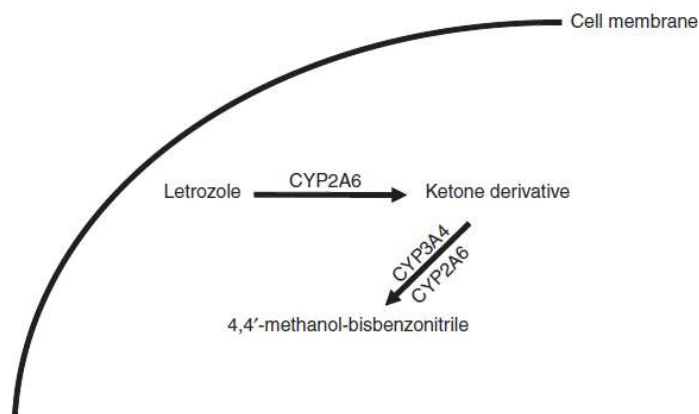


Figura 7. Estrutura química do letrozol.

O fármaco é metabolizado principalmente por oxidação de fase I pelas enzimas CYP3A4 e CYP2A6 – especialmente este último ((Murai et al, 2009) – o seu metabólito farmacologicamente inativo (4,4'-metanol-bisbenzonnitrile), o qual é posteriormente metabolizado por glicoronidação para formar um metabólito inativo conjugado (Lazarus et al, 2010; Jeong et al, 2009), como pode ser visto na figura 8. O CYP2A6 demonstrou maior afinidade para com o letrozol. Em um estudo recente sobre a ação do CYP2A6 (Desta et al, 2011), 261 pacientes foram genotipadas e classificadas como metabolizadores normais (\*1/\*1; n = 200), intermediários (\*1/\*9 e \*1/\*12; n = 40) e lentos (n = 21). As concentrações plasmáticas de letrozol foram significativamente diferentes entre os três grupos, com destaque para uma grande variação interindividual no metabolismo letrozol. No entanto, os achados da literatura sobre o metabolismo detalhado do letrozol *in vivo* ainda são limitadas. Adaptando o tratamento com letrozol para pacientes de acordo com os genótipos CYP2A6 poderia ser possível, se mais informações forem adquiridas.

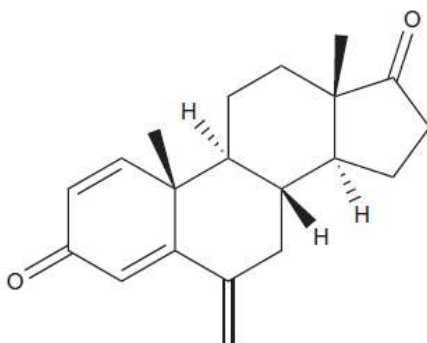




**Figura 8.** O metabolismo detalhado de letrozol ainda não está claro e requer mais investigação. CYP2A6 parece ser a principal enzima responsável pela N-desalquilação do letrozol para formar um derivado de cetona, o qual é posteriormente metabolizado por CYP2A6 e CYP3A4 para um metabolito secundário (4,4'-metanol-bisbenzônitrile). Polimorfismos em CYP2A6 parecem contribuir para o metabolismo alterado do letrozol. Adaptado de Turkistani & Marsh, 2012.

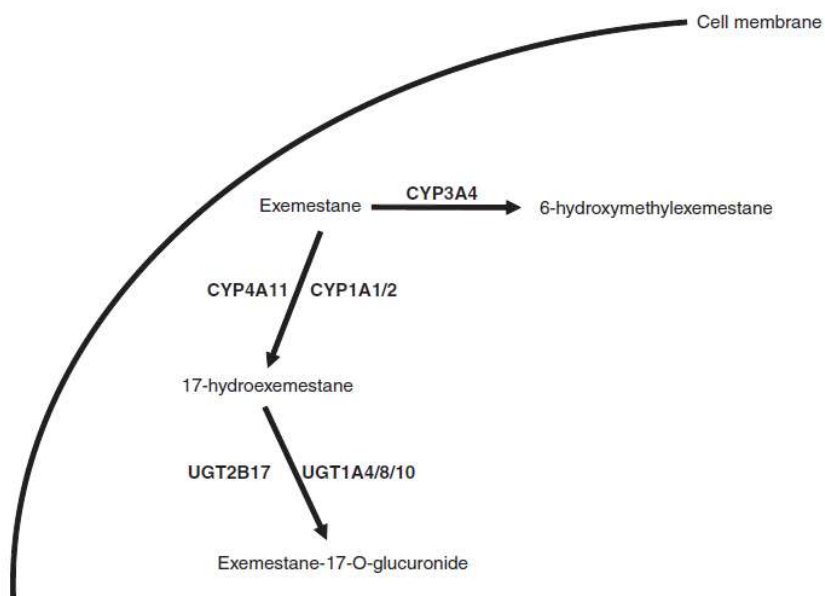
### 1.2.1.3 Exemestano

O exemestano (figura 9), nome comercial Aromasin<sup>®</sup>, é um inibidor esteróide da aromatase não-competitivo, chamado de “substrato suicida” ele se liga de forma irreversível a aromatase inativando-a de forma definitiva. Isso faz com que uma dose diária de 25mg de exemestano reduza em 98% a atividade da aromatase e em mais de 90% os níveis plasmáticos de estrona e estradiol. É um fármaco de absorção rápida, com pico sérico de 2 horas, após administração oral. Sua absorção é potencializada em mais de 40% após ingestão de dieta rica em gordura. Sua metabolização é em grande parte realizada no fígado, onde sofre processos de oxidação e redução. Como é em grande parte excretado na urina, sua dose precisa ser ajustada em pacientes com perda de função renal (Lønning et al, 2000).



**Figura 9.** Estrutura química do exemestano.

A oxidação é catalisada principalmente pela CYP3A4 para formar 6-hidroxi-metil-exemestano, enquanto a redução é catalisada principalmente por CYP4A11 e CYP1A1/2, para formar 17-hidroexemestano (Kamdern et al, 2011). Os polimorfismos genéticos em genes que codificam estas enzimas têm sido referidos como tendo significado clínico (Sachse et al, 2003; Napoli et al, 2005; Keshava et al, 2004; Cho et al, 2005; Mikhailova et al, 2006), por conseguinte, estes polimorfismos potencialmente podem ter efeito sobre o metabolismo do exemestano. A administração concomitante de inibidores potentes de CYP3A4 não afeta as concentrações séricas de exemestano, apesar do medicamento ser oxidado pela CYP3A4. Isso indica que o metabolismo desse fármaco pode ser totalmente realizado por meio de vias reativas (Kamdern et al, 2011), sugerindo que genes dessas vias (*CYP4A11* e *CYP1A1/2*) podem ser até mais importantes do que se pensava. Após a redução, o metabólito 17-hidroexemestano é formado e então glucoronizado pela ação de várias UGTs (UGT2B17, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A4, e predominantemente UGT2B17) (Sun et al, 2010) (Figura 10).



**Figura 10.** Metabolismo do exemestane: a A via de oxidação é catalisada pela CYP3A4, enquanto via redução é catalisada por CYP4A11, CYP1A1 e CYP1A2. A glucuronidação é realizada principalmente por UGT2B17, que tem sido relatada a ter atividade glucuronidation significativa diminuição quando deleção do gene UGT2B17 está presente. Adaptado de Turkistani & Marsh, 2012.

### 1.2.2 Indicações terapêuticas

Após a sua implementação bem sucedida para o tratamento de câncer de mama metastático, os IA de terceira geração (anastrozol, letrozol e exemestano) se tornaram tratamento endócrino adjuvante padrão para câncer de mama receptor de estrogênio positivo em mulheres pós-menopáusicas, havendo indicações do uso dos mesmos em contextos neoadjuvante, adjuvante e em câncer de mama metastático, como será detalhado a seguir.

Uma meta-análise recente não encontrou diferença na eficácia anti-tumoral entre estes três compostos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o anastrozol e letrozol, apesar de uma discreta tendência (sem significância estatística) que favorece o letrozol com relação taxa de mortalidade total. Da mesma forma, nenhuma diferença foi registrada em relação à eficácia do anastrozol *versus* exemestano para tratamento sequencial (3,1% de redução absoluta na taxa de recidiva em 3 anos após divergência entre braço IAs e braço tamoxifeno,  $p < 0,00001$ ). No entanto, o uso dos IA aumenta significativamente a sobrevida quando comparados ao tamoxifeno (redução absoluta de recidiva de 0,7%,  $p = 0,02$ ). (Downsett et al, 2010).

Os resultados dos principais estudos que comparam IA de terceira geração com tamoxifeno para tratamento adjuvante (Kaufmann et al, 2007, Forbes et al, 2008, Regan et al, 2011, van de Velde et al, 2011, Bliss et al, 2012, Dubsy et al, 2012, Boccardo et al, 2013) encontram-se resumidos na Tabela 3. Estes estudos avaliaram duas abordagens de tratamento, o IA em monoterapia ou tratamento sequencial, em que após 2-3 anos de tamoxifeno segue-se o tratamento com IA. Além disso, um estudo (BIG 1-98) também inclui um quarto braço, nos quais pacientes randomizados para 2 anos de letrozol, seguem com 3 anos de tamoxifeno (Mouridsen et al, 2009). A justificativa para a abordagem sequencial baseou-se nos resultados de estudos em contexto metastático, que revelou ausência de resistência cruzada entre o tamoxifeno e os IA.

Assim, a idéia era que a mudança de tamoxifeno para um IA, durante 5 anos de terapia adjuvante pudesse impedir o desenvolvimento de resistência (adquirida). Em relação às duas estratégias principais (monoterapia com IA por 5 anos após a cirurgia e tamoxifeno por 2-3 anos seguido por IA por 3-2 anos com

duração total de 5 anos), ambas estratégias revelaram superioridades em comparação à monoterapia com tamoxifeno na prevenção de recorrência.

Entre 9856 pacientes alocadas em monoterapia ou com tamoxifeno ou com IA, após um período médio de acompanhamento de 5,8 anos, o IA em monoterapia diminuiu a taxa de recidiva de 12,6% (tamoxifeno) para 9,6%. Em relação ao tratamento sequencial (“switch”), quando se analisa as pacientes desde o momento da randomização do *switch*, a taxa de recorrência foi reduzida de 8,1 a 5% em 3 anos de seguimento, com uma redução significativa de 0,7% na mortalidade por câncer de mama entre as pacientes que receberam IA. Com base nos estudos apresentados, os IA tornaram-se agora terapia adjuvante endócrina padrão para pacientes com câncer de mama na pós-menopausa.

**Quadro 3.** Resultados dos principais estudos clínicos em contexto adjuvante comparando inibidores da aromatase de terceira geração e tamoxifeno.

No. pacientes	Droga	Sobrevida		Seguimento	Referência
		DFS	OS		
<b>ATAC</b> 3116 3125 3125	T A T→A <sup>b</sup>	0.90 <sup>a</sup>	0.97	100 meses	Forbes et al (2008)
<b>BIG 1-98</b> 2459 2463 1545 1548	T L L→T T→L	0.86 <sup>a</sup> 1.06 <sup>c</sup> 1.07 <sup>c</sup>	0.87 <sup>a</sup> 0.97 <sup>d</sup> 1.10 <sup>d</sup>	8,1 anos	Regan et al (2011)
<b>ABCSG-8</b> 1849 1865	T T→A	0.80 <sup>d</sup>	0.87 <sup>d</sup>	60 meses	Dubsky et al. (2012)
<b>ARNO 95</b> 490 489	T T→A	0.66 <sup>e</sup>	0.53 <sup>e</sup>	30,1 meses	Kaufmann et al. (2007)
<b>IES</b> 2305 2294	T T→E	0.81 <sup>e</sup>	0.86 <sup>e</sup>	91 meses	Bliss et al. (2012)
<b>TEAM</b> 4868 4898	T/E E	0.97 <sup>d</sup>	1.00 <sup>d</sup>	5,1 anos	van de Velde et al. (2011)

T, tamoxifeno; A, anastrozol; L, letrozol; E, exemestano.

<sup>a</sup> Diferença significativa a favor do IA.

<sup>b</sup> Esse braço do estudo descontinuou o tratamento após a análise de eficácia inicial mostrar nenhum benefício sobre o tamoxifeno. Não há seguimento de longo prazo para esse grupo.

<sup>c</sup> Sem diferença significativa, quando comparado ao letrozol.

<sup>d</sup> Sem diferença significativa.

<sup>e</sup> Diferença significativa a favor da seqüência tamoxifeno-IA.

No entanto, os dados acima resumidos levantam a questão de qual estratégia é a ideal: monoterapia com IA ou tratamento sequencial (*switch*) (Lønning & Eikesdal, 2013). No quarto braço do estudo BIG1-98 (Quadro 3), 1.548 pacientes foram randomizadas para o tamoxifeno por 2 anos, seguido por letrozol durante 3 anos, enquanto 2.563 pacientes receberam monoterapia com letrozol (Mouridsen et al., 2009). Em um período de acompanhamento médio de 71 meses a partir da randomização, a sobrevida livre de doença, bem como a sobrevida global não foram significativamente inferiores no *switch* em comparação com o braço em monoterapia (HR=1,05 e 1,13; respectivamente). Curiosamente, observou-se benefício no grupo de pacientes com linfonodos comprometidos (positivos), o que não ocorreu em pacientes com linfonodos negativos. No estudo TEAM, tamoxifeno por 2,5-3 anos seguidos de exemestano por um período total de tratamento de 5 anos foi comparado com a monoterapia com exemestano (de Velde et al. Van 2011). Após um total de 9.766 pacientes analisadas por período de acompanhamento médio de 5,1 anos, não houve diferença na sobrevida livre de doença entre os pacientes nos dois braços. Quanto ao estudo BIG 1-98, outra comparação interessante foi feita entre pacientes tratadas inicialmente com letrozol por 2 anos seguido de tamoxifeno por 3 anos *versus* letrozol em monoterapia por 5 anos, sendo que, novamente, não houve diferença.

Tomadas em conjunto, estas evidências preconizam a utilização de IA no tratamento adjuvante de mulheres na pós-menopausa. No entanto, até agora, não há fortes argumentos científicos em favor da monoterapia em comparação com a estratégia de *switch*.

O tratamento sistêmico pré-cirúrgico oferece o benefício de reduzir o estadiamento da doença e assim permitir um procedimento cirúrgico mais limitado (Dixon et al, 2009). Além disso, oferece um contexto único para avaliar potenciais fatores preditivos, bem como as mudanças nos parâmetros moleculares (Lønning & Eikesdal, 2013). Vários estudos (Eiermann et al, 2001; Semiglazov et al, 2005; Smith et al, 2005; Cataliotti et al, 2006) compararam os IA e tamoxifeno como tratamento primário neoadjuvante. O letrozol revelou superioridade sobre o tamoxifeno (Eiemann et al, 2001), mas nenhum benefício estatisticamente significativo do anastrozol comparado ao tamoxifeno foi observado nos dois

ensaios realizados com este composto (Smith et al, 2005; Cataliotti et al., 2006). Quanto exemestano, houve benefício na taxa de resposta em comparação com tamoxifeno, mas o número de pacientes era demasiado pequeno para efeitos de comparação estatística (Semiglazov et al, 2005). Durante os últimos anos, o marcador de proliferação Ki67 tornou-se um importante desfecho substituto para análise de resposta à terapia neoadjuvante, pois comparando-se o percentual de células Ki67+ antes e depois de 2 semanas do terapia endócrina, tem-se indicativos de quais pacientes estão propensos a responder com regressão tumoral, inclusive a longo prazo (Dowsett et al, 2007). Pacientes com uma queda substancial dos percentuais de Ki67 alcançam uma melhor resposta a esse tratamento (Dowsett et al, 2011a). Outro benefício da medição percentual de Ki67 é a identificação precoce de pacientes com falha do tratamento, já que o aumento de Ki67, posteriormente se traduz em progressão tumoral clínica (Dowsett et al, 2011b).

O tratamento do câncer de mama metastático mudou nos últimos anos, uma vez que hoje a maioria das pacientes com metástase (e câncer de mama com RE+) já experimentaram progressão da doença em adjuvância com IA. Enquanto os estudos anteriores revelaram a superioridade dos IA em comparação com tamoxifeno (Mouridsen et al, 2001), o fato de que a maioria dos pacientes com tumores metastáticos já recebem um IA para a terapia adjuvante muda o cenário. Quando as pacientes recidivam após mais de um ano do término da terapia adjuvante, a re-implementação do IA pode ser uma escolha razoável. Em contraste, pacientes com recidiva no tratamento ou logo após terminar a terapia adjuvante necessitam de opções de tratamento alternativas. É importante notar que o tamoxifeno (Mouridsen et al, 2003), bem como o fulvestrante (Chia et al, 2008) podem ter efeitos antitumorais em doentes em que os IA falharam. Além disso, o exemestano (IA esteróide) tem se mostrado eficaz entre as pacientes que tornam-se resistentes a um IA não-esteróide (como o anastrozol e o letrozol) (Lønning et al, 2000). Curiosamente, um ensaio clínico randomizado demonstrou uma eficácia semelhante do fulvestrante e do exemestano entre as pacientes que tiveram falha de tratamento com anastrozol ou letrozol falham (Chia et al, 2008). Dessa forma, os dados ainda são insuficientes para se concluir que o fulvestrante

é superior a IA (notadamente o exemestano), tanto na configuração de primeira e segunda linha. No entanto, o fulvestrante é geralmente bem tolerado nesse grupo de doentes e a adesão ao tratamento é assegurada por se tratar de injeções intramusculares de depósito (o que pode ser uma solução em pacientes de baixa adesão) (Lønning & Eikesdal, 2013). Atualmente, não existe um consenso geral sobre sequenciamento ideal da terapia endócrina para câncer de mama metastático.

### **1.2.3 Efeitos adversos e toxicidade**

Clinicamente, o anastrozol parece ter uma boa tolerância clínica, com incidência menor de sangramentos vaginais, fogachos, câncer endometrial, acidentes vasculares cerebrais isquêmicos, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. No entanto, essa medicação tem índices muito mais elevados de dores osteoarticulares e fraturas do que o tamoxifeno, sendo muitas vezes a principal causa de interrupção do tratamento (Wellington & Faulds, 2002). Similarmente ao tamoxifeno, o letrozol também é bem tolerado, sendo os principais efeitos adversos relacionados ao tratamento os fogachos, náuseas e alterações dos cabelos (rarefação e afinamento). Em paciente com doença neoplásica avançada, o letrozol é até mais bem tolerado do que o megestrol. Nos ensaios clínicos com maiores períodos de seguimento, tem se visto que o perfil de efeitos adversos do letrozol tem se ampliado com o surgimento de um maior índice de osteoporose em mulheres tratadas, bem com maior incidência de artralgia, miopatia e artrite (Chabner et al, 2006). O exemestano geralmente é bem tolerado. Descontinuação do tratamento devido à toxicidade é incomum (<3%), mas aumento do apetite, fogachos, sudorese excessiva, edema periférico e náuseas são sintomas frequentemente descritos. Em um ensaio clínico comparando exemestano com tamoxifeno, queixas de artralgia e diarreia foram mais comuns, no entanto sintomas ginecológicos, sangramentos vaginais e câimbras foram mais frequentes no grupo tamoxifeno. Aletrações visuais e fraturas são mais comuns no exemestano (Coombes et al, 2004).

O fato de que um grande número de pacientes com câncer de mama sobrevive, a longo prazo aumenta o foco sobre os potenciais efeitos colaterais de

tratamentos. Com os IA, as principais preocupações referem-se a efeitos prejudiciais sobre o metabolismo ósseo e lipídico, o que pode aumentar o risco de taxas de fraturas osteoporóticas, bem como de doença cardiovascular. A osteoporose é uma grande ameaça à saúde para a população feminina idosa na maioria dos países. O risco de uma fratura de quadril entre as mulheres da Europa Ocidental e dos Estados Unidos está na faixa de 15% a 20% e, em alguns países, como a Suécia, pode exceder 25% (Kanis et al, 2002), estando sempre associadas a um aumento na mortalidade de forma significativa (Johnell et al, 2004).

Em relação aos efeitos dos IA no metabolismo ósseo, é bem estabelecido que todos podem moderadamente aumentar a perda de massa óssea. No entanto, mesmo sabendo-se que o tratamento em curso com IA está associado ao aumento de fraturas (Coates et al, 2007; Coombes et al, 2007; Eastell et al, 2008), em comparação com o tamoxifeno, esses efeitos prejudiciais são reversíveis após o término do tratamento (Geisler et al, 2006). Mesmo com os resultados encorajadores do estudo ABCSG (*Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group*) e do estudo e Zometa-Femara Adjuvant Synergy Trial [Z-FAST (United States) and ZO-FAST (global)] que têm sugerido que o ácido zoledrônico pode impedir completamente a perda óssea mesmo entre as mulheres na pré-menopausa submetidas à ablação ovariana e anastrozol (Gnant et al, 2008; Brufsky et al, 2008), sabe-se que os efeitos prejudiciais sobre o metabolismo ósseo podem ser completamente evitados por meio de avaliação regular com densitometria mineral óssea, suplementação com vitamina D e cálcio e uso de bifosfonados.

Uma segunda grande preocupação associada com a supressão de estrogênio é o potencial para efeitos prejudiciais sobre o metabolismo lipídico (Anker et al, 1995). Enquanto durante décadas, acreditou-se que a terapia de reposição de estrogênio tinha efeito protetor em relação ao risco de eventos cardiovasculares em mulheres pós-menopáusicas, evidências recentes não encontraram redução do risco cardiovascular com terapêutica hormonal de substituição, apesar de confirmar uma elevação de 10-15% nos níveis de colesterol HDL (Anderson et al, 2004; Manson et al, 2003). No que diz respeito



aos efeitos dos IA nos níveis de lipídios plasmáticos, estudos foram conduzidos em amostras fora do jejum ou em pacientes com doença metastática (que muitas vezes sofrem de distúrbios metabólicos), não são confiáveis (Lønning & Geisler, 2008). Com base nas taxas de eventos cardiovasculares em ensaios clínicos de fase III, não há nenhuma evidência substancial sugerindo efeitos nocivos dos IA no que diz respeito à morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com câncer de mama (Lønning, 2010).

Outros efeitos adversos relacionados aos IA que merecem maior atenção são as dores músculo-esquelético e rigidez articular. Embora a maioria dos pacientes apresente sintomas moderados, há evidências de que aproximadamente 20% da população de pacientes não adere ao tratamento com IA por esses sintomas (Partridge et al, 2008), sendo estes os responsáveis por pelo menos 50% das interrupções do tratamento com IA (Dent et al, 2007).

### **1.3 Farmacogenética**

Os estudos clássicos na farmacogenética identificaram variantes em genes únicos, que definem uma resposta específica a determinado fármaco. As fortes correlações entre as variações genéticas e os desfechos farmacológicos definem a área de conhecimento de abrangência da farmacogenética. Na prática atual, os testes farmacogenéticos clinicamente significativos são baseados na interpretação de variantes de genes individuais e em como estas afetam na resposta a determinados medicamentos (Newman, 2010). No entanto, como veremos a seguir, muitos dos efeitos farmacológicos não são determinados por um único gene, mas por vários (poligênicos); sendo que esses genes podem interagir entre si e com fatores ambientais. Entre os princípios gerais da farmacogenética podemos listar, (1) um gene codifica uma proteína (por exemplo, uma enzima metabolizadora) que pode ser relevante na função de diferentes fármacos; (2) diferentes variantes dentro do mesmo gene podem causar diferentes efeitos funcionais (como ausência da proteína, aumento ou diminuição da sua atividade enzimática ou mesmo alteração da sua capacidade de ligação com o fármaco); (3) a mesma enzima pode ter diferentes efeitos funcionais sobre o metabolismo de diferentes fármacos; (4) aparte das variantes genéticas

funcionais, muitos outros fatores (incluindo aderência, comorbidades, co-medicações) podem influenciar no metabolismo do fármaco em questão (Newman, 2010).

Muitas técnicas experimentais estão hoje disponíveis para identificação de variantes genéticas que predispõe a doenças específicas ou podem predizer a resposta individual a determinado medicamento. Os primeiros estudos que foram realizados para identificação de variantes genéticas causadoras de doenças (como a fibrose cística) forma estudos de ligação (*linkage analysis*). Nessa abordagem são necessários múltiplos membros de uma mesma família de afetados pelo mesmo traço e amostras disponíveis de várias famílias, o que inviabiliza o seu uso rotineiro em trabalhos de farmacogenética, já que dificilmente há múltiplos membros da mesma família tratados com a mesma medicação e tendo o mesmo desfecho, sendo uma exceção a hipertermia maligna. Ademais, é custoso, consome muito tempo e quando múltiplos genes causam ou contribuem para determinada condição não é uma técnica efetiva. Dessa forma, a abordagem mais usualmente usada são os estudos de associação com genes candidatos. Nesse tipo de estudo os genes são selecionados com base no seu papel no metabolismo, transporte, excreção, absorção de um fármaco específico. Após a seleção do gene, variantes do mesmo são selecionadas a partir do seu efeito funcional (por exemplo, redução na atividade enzimática). A forma mais disseminada para realização desse tipo de análise é a realização de estudos de caso-controle, onde determinadas variantes são testadas em um grupo tratado com determinada medicação e que tiveram desfechos desfavoráveis (efeitos adversos ou pobre resposta clínica) e outro grupo com desfechos favoráveis (boa resposta clínica ou ausência de efeitos adversos). Nessa situação é interessante que os dois grupos possuam o mesmo *background* genético (em geral, mesmo grupo étnico), tenham sido tratados com a mesma dose da medicação, a indicação de tratamento tenha sido a mesma, as taxas de aderência ao tratamento sejam similares, e fatores com idade e sexo sejam controlados.

Muitos dos estudos de genes candidatos ainda não foram validados (resultados positivamente replicados), pois uma das maiores dificuldades se dá com o delineamento dos estudos: poucos pacientes incluídos (reduzindo o poder

estatístico), genotipagem pouco robusta, desfechos clínicos distintos, pareamento inadequado em estudos de caso-controle ou variantes genéticas diferentes analisadas. Além de um óbvio e significativo viés de publicação, em que trabalhos com resultados positivos (correlação identificada) são mais facilmente publicados, superestimando o efeito do polimorfismo (Newman, 2010).

O desenvolvimento dos sistemas de genotipagem em larga escala permitiu o surgimento de um novo modelo de delineamento na área da farmacogenética, os estudos de GWAS. Apesar de não haver grande quantidade de estudos com esse delineamento (quando comparado aos demais), isso vem mudando com trabalhos realizados com warfarin (Takeuchi et al, 2009), reações adversas a flucoxacilina (Daly et al, 2009) e bifosfonados induzindo osteonecrose mandibular (Sarasquete et al, 2008). O princípio do GWAS é simples, centenas de milhares de SNPs são genotipados em múltiplos indivíduos afetados por determinado traço e comparados a uma população controle pareada que não possui esse traço. Similarmente aos avanços nas tecnologias de genotipagem e sequenciamento, potentes plataformas computacionais e *softwares* vem sendo desenvolvidos para analisar essa vastidão de dados gerados por essas técnicas (Crowley et al, 2009). Uma das grandes vantagens do GWAS é considerar variantes através de todo o genoma, sem viés algum de pré-seleção baseado em conhecimento prévio sobre o metabolismo do fármaco. Dessa forma, genes nunca antes considerados relevantes podem ser identificados e assim desempenhar papel-chave na resposta a determinado fármaco. No entanto, entre as limitações dessa técnica estão os altos custos e baixa disponibilidade dessa tecnologia, além da necessidade de grandes biobancos com dados clínicos disponíveis.

A variabilidade inter-individual de resposta a medicamentos é um problema complexo e comum na prática clínica (Zhou et al, 2009), isso porque inúmeros fatores podem interferir no processo que determina a resposta à determinada medicação, sejam eles especificidade com o substrato, rotas enzimáticas sobrepostas, vasta gama SNPs (Raether et al, 1978), além das variações étnicas (McGraw & Waller, 2012), sendo necessário o conhecimento de uma ampla rede de ajustes de doses e combinações medicamentosas para evitar a falência do tratamento e toxicidade desnecessária (Deenen et al, 2011).

Essas diferenças nas respostas aos fármacos podem ser atribuídas à variabilidade nas sequências de DNA de genes específicos, cujos produtos protéicos (enzimas) são cruciais para o metabolismo destas medicações. Entre essas enzimas descritas, podemos citar as enzimas de fase 1 (tais como citocromo P450 oxidase, CYPs), enzimas de fase 2 (como a uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferase, UGTs) os transportadores por efluxo ou absorptivos (tais como transportadores-cassete ATP-ligantes, transportadores-ABC) (Grover & Kukreti, 2012). A caracterização de estas enzimas e os efeitos dos seus alelos (variantes) sobre o metabolismo de fármacos específicos têm sido descritos na literatura e, recentemente, foram compilados em uma base de dados global chamado SuperCYP (Preissner et al, 2010). Os CYPs são os principais responsáveis por realizar as reações de fase I, as quais incluem oxidação, redução, hidrólise e ciclização, através do uso de oxigênio e NADPH como co-substrato (McLean et al, 2005), representando cerca de 75% do total do metabolismo de medicamentos (Guengerich, 2008).

O Projeto Genoma Humano (PGH) identificou 57 CYPs humanos, que foram classificados em 18 famílias e 43 subfamílias com base na similaridade de seqüências (Ingelman-Sundberg, 2005). A maioria dos CYPs metaboliza mais de uma medicação. Da mesma forma, uma medicação é muitas vezes metabolizada por múltiplos CYPs. Além disso, certos fármacos também podem inibir ou induzir a atividade de determinado CYP, quer através da interação direta com a enzima ou por meio de interferência na sua expressão, cuja caracterização é fundamental para determinar e prever interações entre fármacos compatíveis (Flockhart & Oesterheld, 2000).

Os CYPs humanos são principalmente proteínas associadas a membranas ubiqüamente expressas na maior parte dos tecidos (Berka et al, 2001), no entanto, expressões mais elevadas são geralmente encontradas em tecido hepático (principal órgão metabolizador), apesar da distribuição variar amplamente entre os CYPs, indicando que a eficácia de um fármaco é provavelmente dependente da expressão de determinado CYP no tecido alvo (Culhane et al, 2012). Além disso, diferenças significativas interindividuais na atividade das enzimas, levam a fenótipos diferentes, como por exemplo, no

CYP2D6 onde o alelo mais freqüente é extenso-metabolizador (78,8%), seguido por intermediário-metabolizador (12,1%), pobre-metabolizador (7,6%) e metabolizadores ultra-rápidos (1,5%) (de Leon et al, 2009).

Adicionalmente ao metabolismo dos fármacos propriamente ditos, muitas vezes os CYPs são responsáveis pela ativação dos chamados pró-fármacos (compostos farmacologicamente inativos que requerem ativação via conversão metabólica), tais como antineoplásicos e antipsicóticos (Patterson et al, 1999; Kirchheiner et al, 2004) – o que permite o controle de onde, quando e como a atividade de determinada medicação ocorre. Isto é particularmente importante para fármacos quimioterapêuticos, em que o fármaco ativo idealmente atua apenas sobre as células tumorais, a fim de reduzir os efeitos tóxicos secundários (Tanabe et al, 2012; Guengerich & Shimada, 1998). Polimorfismos nos CYPs podem resultar em ativação aberrante ou ineficaz do pró-fármaco, o que pode levar à toxicidade (Deenen et al, 2011; Huttunen et al, 2008). Felizmente, os avanços na investigação genética tornaram possível a genotipagem de um grande número de pacientes, levando a identificação de SNPs que alteram a expressão ou atividade de enzimas metabolizadoras de medicamentos, conhecimento este que pode facilitar o desenvolvimento de testes para genotipagem eficientes, gerando assim um tratamento melhor e mais personalizado.

### **1.3.1 Farmacogenética do câncer de mama**

Até os dias de hoje, a maioria dos ensaios clínicos analisando aspectos farmacogenéticos e câncer de mama foram conduzidos em pacientes recebendo esquemas heterogêneos de quimioterapia, embora na maioria dos regimes estivesse incluída a ciclofosfamida (CP) (Amend et al, 2008). Muitos estudos avaliaram polimorfismos de fase 2 ou enzimas glutathione S-transferase (GST) em relação ao prognóstico depois do tratamento do câncer de mama. Em um estudo incluindo 92 mulheres com câncer de mama avançado, o genótipo *GSTM1-null* (nulo) não foi associado a características tumorais, sobrevida livre de doença (disease-free survival, DFS) ou sobrevida total (“*overall survival*”, OS) (Lizard-Nacol et al, 1999). No entanto, um estudo retrospectivo com amostra maior demonstrou que mulheres com genótipos homocigotos de baixa atividade

enzimática para o alelo *GSTA1\*B* tiveram maior sobrevida, com o risco de mortalidade reduzido em cerca de 30% (Sweeney et al, 2003) e mulheres com o genótipo *GSTP1 Val/Val* (de baixa atividade) tiveram redução de risco similar (Sweeney et al, 2000). Polimorfismos de deleção nos genes *GSTM1* e *GSTT1* (ambos responsivos espécies reativas de oxigênio resultantes dos processos de radiação e quimioterapia) foram associados à redução de mortalidade quando comparados com mulheres com alelos presentes [HR=0.59; 95% IC=0,29-0.90] (Ambrosone et al, 2001). Em um estudo na China, mulheres com o genótipo *GSTP1Val/Val* tiveram uma redução de 60% no total de mortalidade (HR=0.4; IC95%=0.2-0.8), embora não tenham encontrado associação algumas com variantes dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (Yang et al, 2005). Um estudo menor (n=85) avaliou polimorfismos do metabolismo de fase 1 e fase 2 da CP entre mulheres com câncer de mama metastático ou inflamatório, tratadas com altas dose de CP, cisplatina e carmustine. Os pacientes com o genótipo *GSTM1-null* tiveram aumento da OS, enquanto aqueles com as variantes *CYP3A4\*1B* e *CYP3A5\*1* tiveram sobrevida menor (Petros et al, 2005). Um estudo com 93 pacientes tratados para câncer de mama com paclitaxel identificou que pacientes homozigotos para o genótipo *CYP1B1\*3 Leu/Leu* tiveram significativo aumento na sobrevida livre de progressão (progression-free survival, PFS), quando comparados com pacientes com pelo menos um alelo *Val*. Nesse mesmo trabalho, não foram encontradas quaisquer associações com os genes *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP3A4*, *CYP3A5* e *CYP2C8* (Marsh et al, 2007).

Alguns trabalhos analisaram os efeitos dos genótipos de *MTHFR* sobre a sobrevida do câncer de mama. Um trabalho na população chinesa de Xangai não encontrou qualquer associação entre genótipos *MTHFR* e mortalidade (Shrubsole et al, 2005). Um segundo trabalho analisou o mesmo gene em caucasianos e afro-americanos da região de Baltimore (EUA) e encontrou que portadores do alelo de metabolismo lento (no códon 1298 – A/C ou C/C) tiveram pobre sobrevida, enquanto que aqueles que portavam a variante 677 (C/T ou T/T) tiveram um aumento em relação ao esperado (Martin et al, 2006). Essa associação foi ainda mais forte em mulheres afro-americanas com IHQ negativa

para receptores hormonais, para ambas as variantes (A1298C,  $P_{interaction}=0.088$ ; C677T,  $P_{interaction}=0.026$ ).

Outro exemplo de fármaco muito usado no tratamento do câncer de mama, o tamoxifeno, é um exemplo bem estabelecido de testagem (*CYP2D6*). Pelo menos 70 variantes alélicas de *CYP2D6* foram descritas e são caracterizadas pela atividade enzimática em metabolizadores lentos, intermediários, rápidos e ultrarápidos (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). A frequência dessas variantes genéticas é variável conforme a população. A influência do genótipo de *CYP2D6* no metabolismo do tamoxifeno já foi demonstrada em diversos estudos, como veremos a seguir. A pesquisa farmacogenética de *CYP2D6* relativa ao tamoxifeno foi revista pelo Comitê Consultivo da FDA de Ciências Farmacêuticas em 18 de outubro de 2006, quando sob recomendação unânime foi alterado o rótulo do tamoxifeno para incluir um aviso relacionado ao aumento do risco de recorrência do câncer de mama em mulheres com alterações no metabolismo do *CYP2D6* (Schroth et al, 2009).

Estudos epidemiológicos moleculares têm indicado que variantes genéticas em enzimas conjugadoras de fase 1 e 2 podem influenciar na eficácia do tratamento com tamoxifeno no câncer de mama. Um trabalho sueco verificou que homocigotos para os alelos *CYP2D6*\*4 tiveram maior DFS quando comparados com o do alelo \*1 ( $p=0,05$ ) (Wegman et al, 2007). No grupo de tratamento randomizado para 5 anos de tamoxifeno (ao invés de 2 anos), pacientes homocigotos para *CYP3A5*\*3 tiveram aumento no sobrevida tempo livre de recidiva (relapse-free survival, RFS) (HR=0.02, 95%IC=0.01-0.55). No entanto, esse achado deve ser interpretado com cuidado uma vez que o número de pacientes dentro desse grupo era pequeno. Nenhuma associação foi encontrada entre polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *SULT1A1* ou *UGT2B15* e o tempo de tratamento com tamoxifeno. Em contraste, Goetz et al (2005) não encontrou associação significativa entre *CYP3A5*\*3 e desfechos de câncer de mama; entretanto, mulheres com genótipo \*4/\*4 de *CYP2D6* tiveram pior RFS ( $p=0.023$ ), mas não OS ( $p=0.169$ ); apesar desse resultado não se manter significativo após o ajuste por tamanho tumoral e comprometimento de linfonodos.

Além das isoformas de CYPs, enzimas de fase 2 (incluindo a sulfotransferase 1A1, *SULT1A1* e a UDP-glucuronosiltransferase isoforma 2B15, *UGT2B15*), também estão envolvidas no metabolismo do tamoxifeno e a variabilidade nesses genes em conjunto pode influenciar na sobrevida do câncer de mama. Em uma coorte de mulheres com câncer de mama tratadas com tamoxifeno, aquelas homozigotas para o alelo de baixa atividade de *SULT1A1\*2* tiveram risco de mortalidade aumentado em três vezes quando comparadas as que tinham pelo menos um alelo comum (*\*1*) (HR=2.9, 95% IC=1.1-7.6), não havendo nenhuma associação no grupo de mulheres que não receberam tamoxifeno (Nowell et al, 2002). Quando consideramos os efeitos isolados e combinados de *SULT1A1* e *UGT2B15* sobre a OS e recorrência em mulheres tratadas com tamoxifeno, não há qualquer associação significativa estatisticamente, ainda que haja uma tendência de maior recorrência em portadoras do alelo *UGT2B15\*2* (p=0.11) (Nowell et al, 2005). De toda forma, esta é uma área relativamente nova da pesquisa que está evoluindo rapidamente e, apesar de consórcios internacionais trabalhando em colaboração, os dados ainda são limitados e conflitantes. Portanto, não é possível recomendar testes farmacogenéticos nesta população de pacientes, devendo a pesquisa futura centrar-se nos alelos (além de *CYP2D6*, e incluindo este) que reflitam a resposta do paciente, na relação entre níveis endoxifeno e resultados clínicos, bem como em forma viáveis da implementação de testes farmacogenéticos na prática clínica (Fleeman et al., 2011).

Outros genes envolvidos na farmacogenética do câncer de mama são os *MnSOD* e *MPO*, dos quais determinados genótipos resultam em níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio, cuja associação foi estabelecida com maior índice de sobrevida em mulheres do Arkansas (EUA) (HR=0.33, IC95%=0.13-0.80) (Ambrosome et al, 2005). Outra variantes de *MnSOD*, localizada na região promotora do gene, também foi associada com um significativo decréscimo em RFS (genótipo CC+TT HR=0.65, IC95%=0.40-1.05), embora essa mesma significância não tenha sido encontrada para OS (Martin et al, 2006).



### 1.3.2 Farmacogenética dos inibidores da aromatase

A variabilidade na tolerância clínica aos IA levanta a possibilidade de que a variabilidade genética em pacientes desempenhe um papel importante. A investigação sobre as diferenças farmacogenéticas com os IA está numa fase mais precoce do que com o tamoxifeno (Hadfield & Newman, 2012).

A aromatase, codificada por *CYP19A1*, é o alvo dos IA, assim presença de variantes alélicas em *CYP19A1* podem alterar o resultado do tratamento com IA. O estudo desse gene se iniciou com Ma et al (2005), que identificaram 88 polimorfismos no gene *CYP19A1*, resultando em 44 haplótipos em pacientes de quatro grupos étnicos (caucasianos americanos, afro-americanos, chineses Han americanos, mexicano-americanos), desta análise foram estabelecidos que quatro SNPs (de um total de 88) estão correlacionados com o nível de atividade da aromatase. A substancial variabilidade genética no gene da aromatase entre diferentes grupos étnicos e a grande variação dentro de um mesmo grupo representa um forte incentivo para explorar farmacogenética de IA. No entanto, até recente havia poucos estudos correlacionando variantes genéticas com a eficácia e efeitos adversos, já que a grande maioria dos trabalhos correlacionava esses polimorfismos com o risco de câncer de mama e níveis de estrógenos plasmáticos.

Colomer et al (2008) publicou o primeiro artigo nessa área mostrando que uma variante na região 3'-UTR do gene *CYP19A1* (rs4646) estava associada a aumento do tempo de progressão da doença em uma população de 67 mulheres caucasianas com câncer de mama RE+ metastático tratadas com letrozol. Park et al (2011) analisou variantes de *CYP19A1* e tratamento com letrozol em uma população de pacientes sul-coreanas, encontrando benefício clínico com o tratamento em mulheres portadoras dos SNPs rs10459592, rs4775936 e rs700518. Além disso, esse grupo realizou análise de haplótipos desses polimorfismos, e encontraram um nível de associação destes superior ao dos encontrados com análise individual dos polimorfismos para ambos os desfechos descritos. No entanto, em um trabalho com amostra maior (n=308) esses resultados não conseguiram ser replicados para os mesmo polimorfismos, quando submetidos a uma análise multivariada (Ferraldeschi et al, 2012). No cenário

neoadjuvante, a presença da variante do SNP rs4646 foi associada a pior resposta ao letrozol e a um menor tempo de sobrevida livre de progressão em mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama em estadio II-III (Garcia-Casado et al, 2010), sendo esse resultado especialmente significativo no grupo de mulheres mais idosas que não foram submetidas a cirurgia após indução com letrozol.

Como visto, uma das principais causas para redução da aderência e por conseguinte redução da eficácia dos IA é o perfil de efeitos adversos dessa classe de medicamentos, sendo por isso adequado investigar variantes genéticas no gene CYP19A1 que possam estar correlacionadas a esses efeitos. Um estudo realizado em 390 mulheres caucasianas em tratamento adjuvante com IA para câncer de mama em estadio 0-III revelou que portadoras de pelo menos um alelo com 8 repetições do polimorfismo TTTA<sub>n</sub> em CYP19A1 (rs60271534) tiveram seu risco de artralgia relacionada aos IA reduzido em pelo menos duas vezes (OR=0.41; IC95%=0.21-0.79; p=0.008) (Mao et al, 2011). Na intenção de buscar outras variantes genéticas que pudessem estar correlacionadas a esses efeitos adversos, foi realizado um estudo de GWAS que identificou SNPs associados a manifestações musculoesqueléticas adversas em mulheres tratadas com IA no gene *TCL1A* que, por sua vez, foi relacionado a citocina IL-17, fornecendo um novo foco para pesquisas de pacientes em risco de efeitos adversos dos IA (Ingle et al, 2010). Outros genes relacionados ao metabolismo de IA são os genes *CYP2A6* e *CYP3A5*, cujas variantes genéticas foram relacionadas ao metabolismo de letrozole *in vitro* e ao alguns genótipos de *CYP2A6* (p<0,0001) em pacientes sob tratamento testadas, sugerindo que a via do gene *CYP2A6* deve ser o mecanismo de depuração principal para letrozol *in vivo* (Desta et al, 2011).

Embora existam algumas evidências de que polimorfismos do *CYP19A1* possam predizer a resposta aos IA em pacientes com câncer de mama, uma vasta gama de incertezas ainda permanece presente, exigindo aprofundamente de estudos na área.

#### 1.4 Farmacoeconomia

Nos últimos anos, o setor de medicamentos tem assistido a um crescente interesse pela aplicação de instrumentos de avaliação econômica aos produtos farmacêuticos, área que passou a ser nomeada de *Farmacoeconomia*. Em alguns países como, por exemplo, Portugal, esse interesse foi imensamente reforçado por decisões governamentais (como decretos-leis), que desde 2006 passam a exigir obrigatoriedade de que novos produtos demonstrem vantagem econômica para a sua aprovação. Na verdade, desde a década de 90, países como Austrália e Canadá deram os primeiros passos nesse sentido, distinguindo-se na aplicação concreta de certas medidas farmacoeconômicas, sendo sugerido que a farmacoeconomia vem se tornando a “quarta barreira” para comercialização de produtos farmacêuticos, se somando às tradicionais demonstrações de eficácia, segurança e qualidade de produção (Taylor et al, 2004).

Uma das principais razões aventadas pelo crescimento da farmacoeconomia nos últimos anos é o crescente aumento dos custos em saúde, tanto pelas implementações de novos fármacos, quanto pela introdução de novas tecnologias diagnósticas e terapêuticas. Além disso, essa área se beneficiou enormemente de um clima cada vez mais propício em saúde para o desenvolvimento da chamada Medicina Baseada em Evidências, já que reconhecidamente muitas intervenções em saúde carecem de base científica forte (Sackett et al, 2000).

Adicionalmente, ao contrário de outras técnicas de avaliação utilizadas em na área da saúde, a avaliação econômica reconhece a finitude dos recursos para fazer frente às necessidades, motivo pelo qual, torna-se imperioso nos sistemas de saúde modernos, estabelecer prioridades entre as alternativas que demonstraram eficácia clínica.

As técnicas de avaliação econômica usadas no setor de medicamentos são basicamente as mesmas que se utiliza em outros domínios da área da saúde, como para testes diagnósticos ou outras intervenções médicas. Existem três abordagens principais na avaliação econômica de fármacos, as análises de custo-efetividade, custo-utilidade e custo-benefício. Estes tipos de estudos distinguem-se de outros métodos por corresponderem plenamente à definição mais comum

de análise econômica – análise comparativa de alternativas de intervenção em termos dos seus custos e conseqüências – permitindo responder a questões de eficiência e valor do capital (“*value of money*”) (Drummond et al, 2005).

Um outro tipo de análise econômica, que pode ser considerada parcial, é a chamada Análise de Custos (AC). Esse é um tipo de análise que permite comparar alternativas terapêuticas, mas apenas em termos dos seus custos. Implicitamente, assume-se que as alternativas têm conseqüências idênticas, o que poderá ou não ser verdade. Trata-se de uma análise simples onde, em princípio, todos os custos (fixos, variáveis, diretos, de produtividade e intangíveis), das várias alternativas, devem ser incluídos (Hoffmann et al, 2000). No entanto, na prática, é frequente encontrar estudos na área dos medicamentos que apenas consideram os custos de aquisição dos fármacos (como por exemplo, em termos de doses diárias definidas) sem contemplar outros custos associados, como tratamentos de efeitos secundários, hospitalizações e utilização de meios complementares de diagnóstico. A AC tem um forte pendor contabilístico e se é certo que sua utilização no âmbito da avaliação econômica de medicamentos pode conduzir a poupanças importantes, poderá também contribuir para limitação de ganhos em saúde (nos casos em que as intervenções não tenham conseqüências idênticas ou similares) (Pereira & Barbosa, 2009).

#### **1.4.1 Aspectos farmacoeconômicos da testagem farmacogenética na prática clínica**

A introdução de uma testagem farmacogenética ou de qualquer teste laboratorial na prática clínica requer que exista uma justificativa econômica, pois é insuficiente a simples descrição laboratorial de um determinado genótipo para um indivíduo em particular, sem qualquer extrapolação para o cenário clínico. Além disso, esses resultados devem ser interpretados por pessoal qualificado que leve em consideração o contexto clínico, e que, em última instância, use essas interpretações para potenciais ações de saúde benéficas ao paciente em questão. Idealmente, essas decisões devem levar ao melhor desfecho clínico, dessa forma justificando o custo do teste. Se o teste nunca leva a mudanças no manejo dos pacientes, a farmacogenética se presta somente para propostas de pesquisa.

Sendo assim, quando se realiza pesquisa farmacogenética, alguns pontos de base clínica devem ser atendidos, como saber se o teste conseguirá definir a melhor medicação para o paciente, se efeitos adversos raros ou graves poderão ocorrer e se o teste poderá definir a melhor dose para o fármaco em questão (Limdi et al, 2009).

No entanto, a escassez de evidências clinicamente relevantes apoiando os resultados de pesquisas dos testes de farmacogenética tem sido identificada como um fator limitante para a inclusão das informações farmacogenética em rótulos de medicamentos e à utilização destes testes de forma rotineira (Woods et al, 2011). Esta falta de evidência clinicamente relevante é atribuível ao ambiente regulatório para testes diagnósticos, à dinâmica dos preços de tais exames e às dificuldades de concepção de estratégias de tratamento baseadas em biomarcadores. A divergência entre os requisitos exigidos dos órgãos reguladores (em geral, governamentais) e os órgãos pagadores (planos de saúde, por exemplo) é algo muito bem documentado e sabido (McCabe et al, 2008). Para testes farmacogenéticos, assim como outros diagnósticos, esta divergência é agravada porque a aprovação regulamentar (oficial), em geral, não exige prova direta de benefício clínico a partir de ensaios clínicos randomizados (ECR). Dentro do contexto dos Estados Unidos e da União Européia, a validade analítica do teste (como precisão e consistência de detecção de dado genótipo) acaba sendo o foco principal das agências reguladoras, recebendo uma menor atenção a validade clínica deste mesmo teste (precisão da previsão fenótipo) (Woods et al, 2011). Além disso, os sistemas de reembolso (agentes pagadores) para testes diagnósticos não são baseados no valor do significado dos resultados do exame (e nas suas implicações médicas) e sim na sua semelhança técnica (em termos de complexidade, tecnologia e custos de execução) (Garrison et al, 2007; Ramsey et al, 2006), sendo assim novos testes são baseados nos custos de testes antigos já aprovados (independente do impacto na saúde do paciente e nos custos futuros decorrentes). Assim, a evidência de melhores resultados para os pacientes não se reflete em um preço de reembolso mais ou menos elevado. Soma-se a isso (falta de incentivos regulatórios e de reembolso adequados), a ausência de evidências baseadas em ensaios clínicos adequadamente

delineados sobre tratamentos baseados em biomarcadores (Woods et al, 2011), O resultado disso tudo é uma base de evidência muito limitada que permita avaliar utilidade clínica (saldo entre riscos para a saúde e os benefícios associados com o uso de um teste na prática clínica) e valor econômico (o saldo de desfechos clínicos e seus custos), que em termos finais formam a base para uma alocação eficientes dos recursos em saúde. Com vistas a evitar a perda de tempo na aprovação (e assim prejuízos maiores a saúde e ao sistema sanitário), países como os Estados Unidos, estão condicionando a aprovação de testes à produção de evidências futuras, isto é, o teste fica vigente por determinado período, o qual será utilizado para a produção de evidências sobre o teste, e que serão obrigatórias para sua reavaliação com vistas à manutenção (ou não) da aprovação regulatória (Woods et al, 2011). No entanto, uma orientação clara sobre os métodos que devem ser utilizados, bem como quando investigação adicional é necessária ou de que forma essa pesquisa deve realizada é algo ainda inexistente. Neste contexto, a análise farmacoeconômica permite delinear a melhor decisão, abordando questões econômicas (de custos) que são chaves para tomada de decisão, utilizando-se de dados sobre a utilidade clínica, valor econômico e incertezas em torno do tema.

#### **1.4.2 Farmacoeconomia do câncer de mama**

Como já de amplo conhecimento, o câncer de mama é uma neoplasia com altas taxas de incidência e, como resultado, os custos associados com o seu tratamento têm um impacto significativo no orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados. Atualmente, os tratamentos sistêmicos (quimioterapia ou terapia hormonal) são responsáveis por uma grande parte dos custos decorrentes do tratamento de pacientes com câncer de mama. Uma vez que o aumento dos custos de cuidados de saúde é um fenômeno mundial, em muitos países desenvolvidos, avaliações econômicas tornaram-se a regra, antes da aprovação ser concedida por órgãos reguladores. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde os recursos financeiros disponíveis para a saúde são ainda mais limitados, é imperativo que os custos envolvidos com um novo fármaco antineoplásico potencialmente de maior eficácia e efetividade

devam ser obtidos. Entretanto, análises de custo-efetividade ainda não são a regra, no âmbito dos sistemas de saúde brasileiros (Sasse & Sasse, 2009).

Os sistemas públicos e privados de saúde no Brasil são altamente interligados, sendo que muitas vezes os custos dos cuidados médicos têm sido tradicionalmente divididos entre os governos, planos de saúde e pacientes, já que poucos pacientes são capazes arcar financeiramente com todos os seus custos médicos, motivo pelo qual a maioria usa os sistemas públicos e privados, de forma que o impacto de inovações tecnológicas acabam ocorrendo em todos os níveis (Barros & Bertoldi, 2008). À medida que os custos das novas tecnologias são incorporados aos planos de saúde, menos pessoas têm capacidade financeira para pagar esses planos e mais pessoas se tornam dependentes do governo para obter acesso aos cuidados de saúde. Quando os custos são assumidos pelo governo, os orçamentos fixos levam a restrições de acesso às tecnologias de alto custo e, às vezes, até mesmo para os programas sociais e preventivos (Mano, 2006). Este ciclo aumenta ainda mais a necessidade formal de análises econômicas serem realizadas antes que novas tecnologias sejam adotadas em nosso país.

Usando o exemplo do teste de *CYP2D6* para orientar o tratamento adjuvante do câncer de mama, Woods et al (2011) descrevem como o uso de métodos como a modelagem de decisão juntamente com o uso de valor de informação (value of information, VOI) podem ser usados para avaliar diretamente o valor potencial da implementação futura de tecnologias desenvolvidas. Este exemplo é pertinente devido ao potencial impacto na saúde, a incerteza em torno recomendações para testes de farmacogenéticos e os esforços de investigação em curso para estabelecer a associação genótipo-fenótipo. Para este grupo de pacientes, a terapia hormonal é recomendada por reduzir o risco de recorrência. As evidências para a associação genótipo-fenótipo, sobre *CYP2D6* e desfechos clínicos em mulheres com câncer de mama tratadas com tamoxifeno ainda é contestada. Uma revisão sistemática recente identificou 15 estudos sobre tamoxifeno adjuvante e concluiu que não havia nenhuma associação consistente entre polimorfismos de *CYP2D6* e desfechos no tratamento com tamoxifeno (Terasawa, 2010). A incerteza em torno da associação genótipo-fenótipo e

ausência de prova da utilidade clínica geralmente resulta em recomendações contra a incorporação dos testes farmacogenéticos (Hayes et al, 2008; Higgins et al, 2009).

#### **1.4.3 Farmacoeconomia dos inibidores da aromatase no Brasil**

Análises de custo-efetividade do uso do anastrozol como adjuvante no tratamento de câncer de mama foram publicadas a partir da perspectiva de outros países, como a Grã-Bretanha (Mansel et al, 2007), Bélgica (Moeremans et al, 2006), Estados Unidos (Locker et al, 2006) e Canadá (Rocchi et al, 2007). Esses estudos concluíram que, a partir da perspectiva de seus respectivos países, o anastrozol é um tratamento de custo razoável que é comparável com outros tratamentos antineoplásicos que são aceitos na rotina oncológica geral.

No Brasil não existem muitos trabalhos sobre o impacto econômico dos inibidores da aromatase no sistema de saúde nacional, sendo que um dos trabalhos publicados sobre o tema encontrou um ganho de 0,55 anos na sobrevida para pacientes recebendo anastrozol em relação aos tratados com tamoxifeno, isso com um custo incremental de R\$15.141,15, sendo possível estimar que a custo-efetividade do anastrozol em relação ao tamoxifeno, foi uma redução de gasto de R\$27.326,80 por ano de vida ganho. Esse mesmo grupo, após a realização de simulações de Monte Carlo, mostrou que aproximadamente 50% dos casos apresentaram benefício na sobrevida, e que os custos com o tratamento com anastrozol ficaram abaixo do ponto de corte de R\$29.229,00 por ano de vida ganho, que é o recomendado pela OMS para o Brasil, fazendo com que essa seja uma opção de custo-benefício em comparação ao tamoxifeno no tratamento adjuvante de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama inicial com receptor hormonal positivo (Fonseca et al, 2009).

Em outro trabalho brasileiro, a estimativa da custo-efetividade do anastrozol em comparação ao tamoxifeno para mulheres na pós-menopausa foi calculado a partir de três perspectivas econômicas diferentes: pacientes particulares, planos de saúde e SUS, através da projeção de um modelo de Markov para uma coorte hipotética de 1000 mulheres na pós-menopausa no Brasil, com base em dados do estudo ATAC (Howell et al, 2005) após seguimento



100 meses usando projeções para um período de 25 anos. O benefício incremental também foi incluído no modelo, a fim de obter o custo de cada ano de vida ajustado pela qualidade (“*quality-adjusted life-year gained*”, QALY). Assim, os autores chegaram a uma estimativa de ganho de 0,29 QALY para o anastrozol em relação ao tamoxifeno. O ganho na relação custo-efetividade por QALY dependeu da perspectiva utilizada: um incremento de R\$32.403,00/QALY na perspectiva governamental (SUS), R\$32.230,00/QALY para planos de saúde e de R\$55.270,00/QALY para pacientes particulares – um incremento que é considerado aceitável do ponto de vista do sistema público de saúde e das companhias de seguros de saúde, mas não para pacientes particulares, quando se considera os parâmetros recomendados pela OMS para o Brasil (Sasse & Sasse, 2009).

## Capítulo II – Justificativa

---

## 2. Justificativa

O câncer de mama tem se tornado cada vez mais um importante problema de saúde pública no Brasil, sendo o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e a segunda causa de morte por neoplasia nesse grupo. Como grande parte desses tumores expressa receptores hormonais, a hormonioterapia está definitivamente entre as medidas terapêuticas com maior impacto no controle da doença. Atualmente, o uso dos inibidores da aromatase como homonioterapia cada vez mais vem apresentando resultados superiores ao tradicional tratamento com tamoxifeno, com ampliação das suas indicações. Esse grupo de fármacos apresenta, além de diferentes indicações e respostas clínicas em relação ao tamoxifeno, um perfil de efeitos adversos distinto. Além disso, os custos do tratamento com essas medicações são mais elevados, fazendo com que se torne mais importante ainda a seleção de pacientes que venham a ter benefício com seu uso e condições de manutenção do tratamento ao longo de todo período proposto.

Dessa forma, considerando o impacto do câncer de mama na saúde pública brasileira, especialmente no sul do Brasil, e a grande parcela de mulheres com indicação de uso de inibidores da aromatase, torna-se importante avaliar o valor terapêutico desse grupo de medicações na população brasileira, bem como a ocorrência de reações adversas particulares na nossa população e/ou confirmação da frequência de surgimento das já conhecidas. Além disso, é fundamental que fatores que possivelmente influenciem a resposta ao seu tratamento sejam identificados, com vistas a auxiliar na escolha da estratégia terapêutica mais adequada e eficaz, de forma a aumentar a sua efetividade e custo-efetividade. Fica evidente a importância da realização de estudos genéticos na busca de alvos moleculares em genes que determinem variações de resposta clínica ou de efeitos adversos. Assim, a avaliação farmacogenética dessas pacientes pode ajudar na escolha de um tratamento mais adequado e eficaz, diminuindo falhas terapêuticas e eventos indesejáveis para a saúde.

## Capítulo III – Objetivos

---

### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a existência de variantes genéticas que possam estar associadas à resposta ao tratamento do câncer de mama com inibidores da aromatase;
- Realizar a análise farmacoeconômica do uso de inibidores da aromatase na prática assistencial médica, avaliando o impacto econômico da implementação dessa tecnologia.

### **3.2 Objetivos Específicos**

(1) Avaliar o tempo de recidiva (definida como o tempo entre o diagnóstico e início do tratamento até a documentação de um evento na mama, em qualquer local (loco-regional ou recidiva à distância ou na mama contralateral) relacionado com as variantes genéticas);

(2) Avaliar a sobrevida livre de doença (definido como o tempo para a primeira ocorrência de evento na mama, ocorrência de um segundo tumor primário não de mama ou óbito por qualquer causa) relacionada com as variantes genéticas;

(3) Avaliar a sobrevida total (definida como o tempo entre o diagnóstico e início do tratamento até a morte) relacionada com as variantes genéticas;

(4) Avaliar a ocorrência de eventos adversos musculoesqueléticos: dores articulares, dores musculares, dor óssea, artrite, diminuição da função articular ou outro problema musculoesquelético, relacionados com as variantes genéticas;

(5) Avaliar a idade e o tempo para ocorrência dos eventos adversos musculoesqueléticos (em relação a idade de início do tratamento), relacionada com as variantes genéticas;

(6) Avaliar a ocorrência de outros eventos adversos, incluindo efeitos adversos graves (definido como morte, evento com risco de vida, evento causando internação prolongada, evento causando dano/deficiência permanente ou temporária, ou eventos que necessitam de intervenções para prevenir dano/deficiência permanente), relacionada com as variantes genéticas;

(7) Realizar avaliação de custos do uso de inibidores da aromatase no Sistema Único de Saúde;

## Capítulo IV – Artigo 1

---

**Influence of CYP19 polymorphisms on the treatment of breast cancer with aromatase inhibitors: a systematic review and meta-analysis**  
Artigo submetido à revista *BMC Cancer*

**Influence of *CYP19* polymorphisms on the treatment of breast cancer with aromatase inhibitors: a systematic review and meta-analysis**

Osvaldo Artigalás<sup>1,2</sup> ([artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)), Tazio Vanni<sup>3</sup> ([taziovanni@gmail.com](mailto:taziovanni@gmail.com)), Mara Helena Hutz<sup>1</sup> ([mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)), Patricia Ashton-Prolla<sup>1,4</sup> ([pprolla@gmail.com](mailto:pprolla@gmail.com)), Ida Vanessa Schwartz<sup>1,4</sup> ([idadschwartz@gmail.com](mailto:idadschwartz@gmail.com)).

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Genetics Unit, Children's Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil. <sup>3</sup>Department of Science and Technology, Ministry of Health, Brasília, DF, Brazil.

<sup>4</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Osvaldo Artigalás

UFRGS - Campus do Vale - Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M CEP: 91501-970 - Caixa Postal 15053 - Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: 55-51-33086722

Email: [artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com).



## **Abstract**

**Background:** Many clinical trials have shown the efficacy of aromatase inhibitors (AIs) in the management of breast cancer (BC). There is growing evidence that *CYP19A1* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with clinical response (CR) and adverse effects (AEs) among BC patients treated with AIs. The aim of this study was to analyze the association between *CYP19A1* polymorphisms and AI treatment in BC patients.

**Methods:** A systematic review was performed in MEDLINE, EMBASE and LILACS. A meta-analysis was conducted to compare the association between *CYP19A1* variants and treatment response among BC patients.

**Results:** A total of 12 studies were included in the final analysis. There was significant variation among the populations studied and the SNPs and outcomes investigated. A meta-analysis was only possible for the evaluation of SNP rs4646 vs. the wild-type variant with respect to time to progression (TTP) among metastatic BC patients treated with AI. TTP was significantly increased in patients with the rs4646 variant compared with the wild-type gene (hazard ratio (HR)=0.51 [95% confidence interval (CI)=0.33-0.78], p=0.002). Seven studies analyzed the association between AEs with different polymorphisms of *CYP19A1*. Although there was a statistically significant association with musculoskeletal adverse events (rs934635, rs60271534, rs700518rs and haplotype M\_3\_5) and with vasomotor symptoms (rs934635, rs1694189, rs7176005 and haplotype M\_5\_3) in individual studies, similar associations were not observed in further studies. No statistically significant association between musculoskeletal AEs and SNPs rs4646, rs10046, rs727479 and rs1062033 was found.

**Conclusions:** These findings suggest that the presence of the rs4646 variant may be a predictive factor of the benefit of AI treatment for BC. The effects of *CYP19A1* polymorphisms on clinical outcomes were most often detected in individual studies, suggesting that longer-term studies will better clarify these associations. Additional studies are needed to clarify the predictive value of other SNPs and whether *CYP19A1* genotyping should be used to guide AI treatment.

**Key Words:** Aromatase inhibitors, breast cancer, *CYP19A1*, pharmacogenetics, systematic review, meta-analysis, adverse effects, clinical outcomes

## Background

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women, and it accounts for the majority of cancer-related deaths among women worldwide, representing 23% of all cancer diagnoses and 14% of cancer-related deaths. In developing countries, BC has also replaced cervical cancer as the current leading cause of cancer deaths among women [1,2].

Several studies have identified the role of estrogen and its metabolites in the development of BC [3,4]. Initially, tamoxifen (a selective estrogen receptor modulator, SERM) was considered to be the optimal treatment for hormone-responsive BC in both premenopausal and postmenopausal women [5]. Recently, aromatase inhibitors (AIs) have emerged as relatively novel therapeutic options for BC patients [6].

AIs are classified as steroidal (type I, exemestane) and nonsteroidal (type II, anastrozole and letrozole) [7]. Currently, the three AIs have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) for use in postmenopausal women with hormone receptor-positive BC at both the adjuvant and metastatic stages [8]. AI treatment improves disease-free survival (DFS), and lowers the rates of local recurrence, metastatic recurrence, and the incidence of contralateral BC compared with tamoxifen when used as an adjuvant therapy in postmenopausal women with estrogen receptor-positive (ER+) BC [9,10]. AIs produce significantly lower recurrence rates compared with tamoxifen, either as initial monotherapy or after 2 to 3 years of tamoxifen [9,10].

Aromatase is a cytochrome P450 enzyme complex that is encoded by *CYP19* located on chromosome 15q21.2 [11] and that catalyzes a critical reaction in estrogen biosynthesis involving the formation of aromatic C18 estrogens (estrone and estradiol) from C19 androgens (androstenedione and testosterone) [12]. It is expressed especially in the ovaries as well as several extragonadal tissues (subcutaneous fat, brain, liver, bone, vascular endothelial tissues and the mesenchymal cells of the adipose tissue in the breast) [12]. Ma *et al.* [13] "resequenced" all coding exons, all upstream untranslated exons plus their presumed core promoter regions, all exon-intron splice junctions, and a portion of

the 3'-untranslated region of CYP19 using 240 DNA samples from patients of four ethnic groups and identified eighty-eight polymorphisms that resulted in 44 haplotypes. Many studies have reported an association between the BC risk and *CYP19A1* genotype [14-16].

Recently, following the publication of randomized controlled trials (RCTs) demonstrating the efficacy of AIs in the treatment of BC [17-19], additional studies have reported associations between *CYP19A1* polymorphisms and clinical response (CR) and/or adverse effects (AEs) in BC patients treated with AIs [20,21]. Considering the potential associations of *CYP19A1* polymorphisms with BC risk, estrogen levels and variable aromatase activity levels, it is reasonable to propose that *CYP19A1* genotype has an impact on AI treatment response and ultimately patient survival [22].

Retrospective cohort and case-control studies have been published assessing the role of *CYP19A1* variants; however, most of these studies involved patients with different characteristics and included only small sample sizes. Consequently, their results are subjected to considerable heterogeneity and uncertainty. The present study is the first to systematically review the international literature and to conduct a meta-analysis of current studies to assess the associations of *CYP19A1* genotype with clinical outcomes and AEs in BC patients treated with AIs.

## **Methods**

### **Search strategy**

MEDLINE, EMBASE, and LILACS databases were searched using the following terms: ("aromatase inhibitor" OR "anastrozole" OR "letrozole" OR "exemestane") AND ("cyp19a1" OR "aromatase gene" OR "aromatase polymorphism" OR "human cytochrome p450 aromatase" OR "cytochrome p450 19a1" OR "cyp19"). The search was performed on November 17, 2014. No language restrictions were applied. All references from review articles and retrieved articles were screened for additional publications on the subject. A second search was conducted in MEDLINE using the terms "aromatase inhibitors"

AND "breast cancer" with the following filters: "clinical trial" AND "published in the last 10 years." A third search was performed using the following strategy: ("first and last author of the articles from the previous search") AND ("cyp19a1" OR "aromatase gene" OR "aromatase polymorphism" OR "human cytochrome p450 aromatase "OR" cytochrome p450 19a1 "OR" CYP19 ") OR ("pharmacogenomics" OR "pharmacogenetics"). All titles and abstracts were screened by two independent researchers (OA and TV). During the data extraction process, complementary information not available in the selected articles was also searched for in clinical trial registries (<http://www.clinicaltrials.gov>, <http://www.controlledtrials.com>, and the Cochrane Register of Controlled Trials); we also contacted the authors of an included article [23] seeking specific details, but our efforts were unsuccessful.

### **Selection criteria**

Studies met the inclusion criteria and were considered eligible if they involved women with BC who were treated with AIs (letrozole, anastrozole, or exemestane), genotyped for *CYP19A1* and if an assessment of clinical outcomes was included. Non-clinical outcomes or pharmacodynamic studies, case reports, reviews and opinions as well studies of AIs other than letrozole, anastrozole, or exemestane were excluded. If multiple article from the same study were identified, the most recent publication was included in the analysis.

### **Assessments and data extraction**

Two investigators (OA and TV) independently reviewed, evaluated and extracted data from each included article. Conflicting evaluations were resolved following a discussion with a third reviewer (IVS). The review was performed according to the Cochrane Collaboration guidelines [24,25].

Both authors independently extracted information using pre-designed forms. The following information was extracted: study design, characteristics of participants, setting, intervention, treatment duration, clinical outcome, and AEs. When studies included several subgroups that did not fulfill the inclusion criteria, only those subgroups that met the inclusion criteria were included.

## **Statistical analysis**

Summary hazard ratios (HRs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) were estimated for time to progression (TTP). Statistical heterogeneity was assessed by performing the  $\chi^2$  test (assessing the p value) and by calculating the  $I^2$  statistic. If  $p < 0.10$  and  $I^2 > 50\%$ , indicating heterogeneity, a random-effects model was used; otherwise, the fixed-effects model was used [26]. Analyses were performed using the “*metan*” package in STATA version 13.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) [26]. This package uses the Mantel-Haenszel method to calculate the fixed-effects model. A Forest plot was used to illustrate the results of the meta-analysis.

## **Results**

### **Search results**

The literature search identified 145 publications (Fig. 1). A total of 127 articles were rejected after the titles and abstracts were screened. Eighteen articles were fully evaluated. Six were excluded because 3 studies did not report relevant clinical outcomes (hormonal and gene expression levels) [23,27,28] and 3 studies assessed AIs in non-BC patients (endometrial cancer) [29-31]. Therefore, 12 studies in total were included. Among the 12 studies, 3 assessed AIs as neoadjuvant therapies [32-34], 4 assessed AIs as adjuvant therapies for patients with stages 0-III BC [35-38], and 5 assessed AIs as adjuvant therapies for patients with advanced breast cancer (ABC) [20,21,23,39,40]. (Table 1).

### **Studies characteristics**

Most studies (n=10) involved Caucasian patients. Two included African Americans, who represented less than 10% of the total sample, another two included Asians, who represented less than 20% of the total samples. Seven studies included only postmenopausal patients [20,33-38], One study included both pre- and postmenopausal patients [21], and 4 studies did not clearly state this information. In 3 studies, the sample populations consisted only of patients who

received letrozole [20,21,34], in 2 studies, patients received anastrozole [23,33], and in one study, patients received exemestane alone [38]. In the 6 remaining studies, the sample populations were composed of women who received any of the three AIs (anastrozole, letrozole or exemestane).

Association analyses between outcome and *CYP19* polymorphisms were heterogeneous. Four studies examined TTP [20,21,23,39], and only 2 examined overall survival (OS) [23,39]. One study examined DFS [37], one examined time to treatment failure (TTF) [40], and one examined progression-free survival (PFS) [34]. In addition, Park *et al.* [21] correlated *CYP19* polymorphisms with the clinical benefits (CBs) of AIs according to Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST), version 1.0. The AEs of AI were described in 7 studies [20,21,23,35-38].

### **TTP and *CYP19A1* variants**

Four studies reported an association between *CYP19A1* polymorphisms and TTP in women with metastatic ABC. The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs4646 was analyzed in two studies, which were meta-analyzed. This analysis demonstrated that TTP is significantly increased in patients with the rs4646 T allele (in homo- or heterozygosis) compared with patients with only wild-type (WT) alleles (HR=0.51 [95% CI=0.33-0.78], p=0.002) (Fig. 2). No statistical heterogeneity was detected in these analyses ( $\chi^2=0.01$ , p=0.929;  $I^2=0.0\%$ ).

Colomer *et al.* [20] also analyzed the associations of TTP in relation to two other SNPs (rs10046 and rs727479) but did not identify any significant differences (p=0.3 and p=0.9, respectively). Liu *et al.* [23] reported the absence of an association between rs10046 variants and TTP (14.93 months vs. 16.89 months; p=0.94). Miron *et al.* [39] did not identify associations between TTP and SNPs, rs10046 (p=0.070), and rs727479 (p=0.052). However, they observed an association between increased TTP and the presence of the rs700518 G allele (p=0.035).

Park *et al.* [21] performed a haplotype analysis and reported that M\_1\_3 is associated with a significantly longer TTP (11.08 months [95% CI=6.75–15.42] vs. 5.61 months in non-M\_1\_3 patients [95% CI=0.00–11.45], p=0.040) in addition to

M\_2\_1 (12.95 months [95% CI=9.27–16.63] vs. 7.31 months in non-M\_2\_1 patients [95% CI=4.63–9.99],  $p=0.038$ ). When the analysis considered only the individual variants (in a two-way analysis: homozygous vs. heterozygous), no significant difference in median TTP was observed between SNP carriers and wild-type individuals for rs700518 (12.07 months [95% CI=8.67–15.46] vs. 7.54 months [95% CI=6.53–8.55],  $p=0.097$ ), rs4775936 (11.93 months [95% CI=8.83–15.04] vs. 7.54 months [95% CI=6.57–8.51],  $p=0.205$ ) or rs10459592 (11.93 months [95% CI=8.66–15.21] vs. 7.74 months [95% CI=6.51–8.97],  $p=0.176$ ).

### **OS and CYP19A1 variants**

The association between rs4646 and OS was described in two studies. Liu *et al.* [23] reported a statistically significant association between the presence of one or two rs4646 T alleles (G/T or T/T) and increased OS (37.3 months vs. 31.6 months,  $p=0.007$ ) in women with metastatic BC. However, Miron *et al.* [39] did not detect a significant association with OS after analyzing the same SNP. SNP rs10046 was also studied in these two papers. Miron *et al.* [39] described a significantly increased OS in patients carrying the T allele ( $p=0.046$ ). However, Liu *et al.* [23] failed to observe a similar association with OS ( $p>0.050$ ). In addition, Miron *et al.* [39] studied two other SNPs, including rs727479, which was also associated with significantly increased OS when heterozygous (T/G) ( $p=0.003$ ) or homozygous (T/T) ( $p=0.080$ ). In the same study, rs700518 was not associated with a change in OS ( $p>0.050$ ).

### **DFS and CYP19A1 variants**

Miron *et al.* [39] performed the only study examining DFS, which included 53 patients and assessed 4 SNPs. The presence of SNP rs4646 ( $p>0.050$ ), rs10046 ( $p=0.630$ ), or rs700518 ( $p>0.050$ ) was not associated with DFS. The presence of SNP rs727479 T allele was associated with increased DFS in both heterozygous (G/T) ( $p=0.011$ ) and homozygous (T/T) individuals ( $p=0.040$ ).

### **TTF and CYP19A1 variants**

Ferradelschi *et al.* [40] examined TTF in 308 women with metastatic BC treated with AIs, including 56 variants of *CYP19A1*. Patients carrying the rs4775936 T allele were found to exhibit significantly increased TTF relative to patients with the reference allele (HR=0.79 [95% CI=0.66-0.95], p=0.012). Similar results were observed in patients with more than 7 TTTA repeats in SNP rs60271534 compared with fewer repeats (HR=0.84 [95% CI=0.7-0.99], p=0.04). Notably, when subjected to a multivariate analysis, these SNPs exhibited no significant association with TTF.

### **PFS and CYP19A1 variants**

Garcia-Casado *et al.* [34] examined PFS in 95 women with postmenopausal BC treated with neoadjuvant letrozole with a median follow-up time of 40.6 months. Patients with the rs4646 A allele [in either heterozygous (A/C) or homozygous (A/A) status] did not present a significant reduction in PFS (p=0.0686). However, in a subgroup analysis of women who were not subjected to surgery after letrozole induction, this association was significant (p=0.009).

### **CR and CYP19A1 variants**

CRs were assessed by measuring the size of lesions either by direct comparisons of tumor size [31] or using the RECIST score [21,33].

Wang *et al.* [32] described the absence of any association (p>0.05) between 48 SNPs (including rs6493497 and rs7176005) and tumor size in pre- and post-AI neoadjuvant treatment in 52 women with BC. Considering responsiveness to treatment as a ≥30% reduction in tumor volume, Ghimenti *et al.* [33] did not observe a statistically significant association in relation to SNPs rs6493497 and rs7176005 in a neoadjuvant scenario. Park *et al.* [21] allocated patients achieving a complete response or a partial response or patients with stable disease for more than 6 months (SD of approximately 6 months) to the clinical benefit (CB) group. Patients presenting progressive disease or stable disease for <6 months during treatment were placed in the non-CB group (NCB). They analyzed 47 SNPs and identified statistically significant associations



between CB and rs700518 (odds ratio [OR]=2.52 [95% CI=1.02-6.20], p=0.044), rs10459592 (OR=2.61 [95% CI=1.6-6.46], p=0.038) and rs4775936 (OR=2.89 [95% CI=1.16-7.22], p=0.023) after adjusting for age, HER2 positivity, number of metastatic lesions and liver metastasis. Haplotype analysis revealed an association between CB and haplotypes M\_1\_3 (OR=5.33 [95% CI=1.63-17-45], p=0.006) and M\_2\_1 (OR=3.37 [95% CI=1.43-7.90], p=0005).

### **AEs and CYP19A1 variants**

Compared with tamoxifen, AIs are associated with higher risks of osteoporosis, fractures, cardiovascular complications, and hypercholesterolemia. In addition, AIs are associated with musculoskeletal side effects and may reactivate ovarian function (e.g., cause hot flashes) [41]. AEs were reported in 7 of the 11 articles included in this review. Nonetheless, one of the 7 articles only reported the presence or absence of any AE [20], and they did not observe significantly increased frequencies of any AEs when analyzing SNPs rs4646, rs10046, or rs727479 in 67 women with postmenopausal ABC treated with letrozole. No patient in this study interrupted treatment due to AEs.

#### **Vasomotor symptoms (VMS)**

Fontein *et al.* [38] observed 737 patients receiving adjuvant exemestane and noted that the homozygous AA genotype of rs934635 was associated with a significantly higher odds of VMS (multivariate OR=2.78, p=0.044). In addition, for both rs1694189 and rs7176005, the homozygous variant genotypes (TT) were associated with a higher odds of VMS (univariate OR=1.758, p=0.025 and OR=6.361, p=0.021, respectively). Park *et al.* [21] described an association between haplotype M\_5\_3 (including rs1902586, rs7181886, rs936306, rs1902582, rs16964254, and rs28566535) and hot flashes (OR=4.12, [95% CI=1.09–15.61], p=0.03).

### **3.9.2 Musculoskeletal adverse events (MS-AEs)**

In relation to treatment-related MS-AEs, Liu *et al.* [23] found that the proportion of AEs among women with metastatic BC treated with anastrozole did not differ when stratified by SNPs rs4646 (p=0.894), rs10046, rs2830, rs9926298

and rs9939609 (data not shown). Fontein *et al.* [38] reported that the homozygous AA genotype of rs934635 was associated with a significantly higher odds of MS-AEs (multivariate OR=4.66,  $p=0.008$ ), but this association was not found in any other of the 29 SNPs analyzed. Furthermore, Henry *et al.* [35] analyzed 138 variants in 24 genes (including 23 *CYP19A1* SNPs) in 432 BC patients and observed a non-significant increase in MS-AEs when at least 8 rs60271534 repeat alleles were present (HR=1.8 [95% CI=0.8-1.8],  $p=0.49$ ). No other associations were identified.

Park *et al.* [21] described the association between haplotype M\_3\_5 (including rs12148604, rs4646, rs10046, rs700519, rs4324076, rs700518, rs3759811, rs727479, rs4775936, rs10459592, rs767199, rs10519297, rs1062033, rs2008691, rs1008805, and rs17523527) and MS-AEs (bone pain and arthralgia) in 66 of 109 patients included in their study (OR=11.25, [95% CI=1.17–108.28],  $p=0.01$ ), but no other significant associations were reported. Finally, Mao *et al.* [36] analyzed five SNPs in 390 patients, reporting no association between MS-AEs and SNPs rs749292 ( $p=0.57$ ), rs727479 ( $p=0.94$ ), rs10046 ( $p=0.20$ ), or rs11575899 ( $p=0.80$ ). For SNP rs60271534, subjects with at least one TTTA 7-repeat allele had a higher risk of MS-AEs ( $p=0.03$ ), whereas patients with at least one TTTA 8-repeat allele had a lower risk of aromatase inhibitor-associated arthralgia (AIAA) ( $p=0.03$ ). In addition, Napoli *et al.* [37] analyzed 97 patients treated with AIs and assessed the possible associations between SNPs rs4646, rs700518 and rs1062033 and bone loss. They did not observe any significant phenotypic differences in patients with distinct genotypes with respect to rs4646 and rs1062033. The presence of the homozygous rs700518 A allele (AA) was associated with a greater loss of bone mineral density (BMD) in both the lumbar spine ( $p=0.03$ ) and hip ( $p=0.03$ ) compared with other genotypes (AG+GG).

## **Discussion**

There is growing evidence that polymorphic gene variants can contribute to differences in complex traits between individuals, and the assessment of genes involved in drug metabolism will provide valuable information for treatment planning. Although AI efficacy among BC patients has been proven, there is

significant variability in response rate and AE frequency. Therefore, tests that are able to predict treatment response and prognosis would be valuable in the management of these patients. We investigated evidence of the association between *CYP19A1* genotypes and clinical outcomes following treatment with AIs in BC patients. A total of 12 studies were included in this systematic review. To our knowledge, this is the first systematic review and meta-analysis published on the association between *CYP19A1* polymorphisms and AI treatment in BC patients.

TTP was analyzed as an outcome in four studies [20,21,23,39]. In this meta-analysis, SNP rs4646 was the only SNP associated with increased TTP, suggesting that this variant is likely involved in the response to AI throughout tumoral evolution. SNPs rs10046 [20,23,39], rs700518 [21,39] and rs727479 [20,23] did not exhibit any associations with TTP. Due to the heterogeneity between the patient groups, pooling of data was only possible for SNP rs4646.

Liu *et al.* [23] reported an association between SNP rs4646 and increased OS ( $p=0.007$ ), but the same was not observed for SNP rs10046 ( $p>0.05$ ). In contrast, Miron *et al.* [39] found no association between OS and rs4646 ( $p>0.05$ ) but did identify an association between OS and rs10046 ( $p=0.003$ ). These conflicting data suggest that *CYP19A1* genotypes may be associated with OS in BC patients treated with AIs. However, the magnitude of this association appears highly variable between patients.

The variations in the definitions of DFS, PFS and TTF among studies limited pooling in our analysis. The results involving DFS (positive association with SNP rs727479,  $p=0.011$ ), TTF and PFS (no significance association with any SNP) were quite limited in terms of number and heterogeneity of studies, but the overall lack of effect observed may indicate that there are in fact no differences or that the follow-up times used were insufficient to detect relapse/recurrence.

Six studies reported AEs related to AIs [20,21,23,35-37], but only 5 studies specifically described these AEs as hot flashes [21] or as musculoskeletal complaints [20,23,35-37], and the majority did not analyze their associations with SNPs. Notably, SNPs rs4646, rs10046, rs727479 and rs1062033 were evaluated in three studies. None of them reported significant associations between *CYP19A1* SNPs and MS-AEs arising from AI treatment [20,23,36,37].

This systematic review and meta-analysis was subjected to limitations. There was inherent heterogeneity in the patient characteristics, polymorphisms, AIs used, clinical settings, and pretreatment regimens. Most of the studies included were retrospective. Therefore, we cannot exclude that other unknown confounders may have biased the results. Studies describing adherence to AI treatment are important because the limited data available have suggested that the most common reason for discontinuing treatment is MS-AEs, which was reported to be responsible for treatment discontinuation in 10-20% of the patients in all of the included studies [42-44]. It is possible that reduced compliance by some patients may have led to underestimation of the benefits of AI treatment.

## **Conclusions**

This systematic review of the literature revealed associations between *CYP19A1* polymorphisms and clinical outcomes and AEs in BC patients receiving AIs. The effects of *CYP19A1* polymorphisms on clinical outcomes were most often detected in individual studies, suggesting that longer-term studies will better clarify these associations. Results such as the association of SNP rs4646 with longer TTP as well as the association of rs934635 and M\_5\_3 haplotype with VMS and the genetic variants M\_3\_5, rs700518 and rs60271534 with osteoarticular symptoms are significant outcomes indicating the impact of these variants on treatment with AIs in BC. Hence, *CYP19A1* polymorphisms are potentially useful biomarkers for predicting prognosis and AE profiles in BC patients and may become a promising tool to help physicians in making therapeutic decisions in the future, although the exact role of *CYP19A1* has yet to be clarified when taking the different clinical settings and disease stagings into account. Additional studies must be conducted with larger sample sizes, more homogeneous patient populations, and using standardized outcomes and genotyping strategies to allow for a comprehensive understanding of these associations.

**List of abbreviations**

ABC - advanced breast cancer

AIs - aromatase inhibitors

AEs - adverse effects

BC - breast cancer

BMD - bone mineral density

CR - clinical responses

DFS - disease-free survival

ES - effect size

FDA - US Food and Drug Administration

HRs - hazard ratios

MS-AEs - aromatase inhibitor-related musculoskeletal adverse events

SNP - single nucleotide polymorphism

OS - overall survive

PFS - progression-free survival

RCTs - randomized clinical trials

RECIST - Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

SNP - single-nucleotide polymorphism

TTF - time to treatment failure

TTP - time to progression

VMS – vasomotor symptoms

WT - wild-type

**Competing interests**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Authors' contributions**

OA (designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript), TV (designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript), MHH (designed the study and wrote the manuscript), PAP (designed the study,

analyzed the data, and wrote the manuscript), IVS (designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript).

### **Acknowledgments**

We are grateful to the post-graduate program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011;61(2):69-90.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74–108.
3. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000;27:67-73.
4. Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000;27:75-93.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365:1687-717.
6. Rugo HS. The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors. *Ann Oncol*. 2008;19:16–27.
7. Schneider R, Barakat A, Pippen J, Osborne C. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: an update. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2011;3:113-25.
8. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;125:13–22.
9. Aydiner A. Meta-analysis of breast cancer outcome and toxicity in adjuvant trials of aromatase inhibitors in postmenopausal women. *Breast*. 2013;22:121-9.
10. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, Buyse M, Baum M, Buzdar A, Colleoni M, Coombes C, Snowdon C, Gnant M, Jakesz R, Kaufmann M, Boccardo F, Godwin J, Davies C, Peto R. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2010;28:509-18.
11. Chen SA, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, Hall PF, Shively JE. Human aromatase: cDNA cloning, southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA*. 1988;7:27–38.

12. Akhtar M, Wright JN, Lee-Robichaud P. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 $\alpha$ -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125:2-12.
13. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Corone IJ, Pelleymounter L, Wang L, Eckloff BW, Schaid D, Wieben ED, Adjei AA, Weinshilboum RM. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005;65:11071-82.
14. Ma X, Qi X, Chen C, Lin H, Xiong H, Li Y, Jiang J. Association between CYP19 polymorphisms and breast cancer risk: results from 10,592 cases and 11,720 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122:495-501.
15. Zhang L, Gu L, Qian B, Hao X, Zhang W, Wei Q, Chen K. Association of genetic polymorphisms of ER-alpha and the estradiol-synthesizing enzyme genes CYP17 and CYP19 with breast cancer risk in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;114:327-38.
16. Talbott KE, Gammon MD, Kibriya MG, Chen Y, Teitelbaum SL, Long CM, Gurvich I, Santella RM, Ahsan H. A CYP19 (aromatase) polymorphism is associated with increased premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111:481-7.
17. Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group, Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial *Lancet Oncol.* 2008;9:45–53 [DOI: [10.1016/S1470-2045\(07\)70385-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70385-6)] [PubMed: [18083636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18083636/)].
18. Coates AS, Keshaviah A, Thürlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Colleoni M, Láng I, Del Mastro L, Smith I, Chirgwin J, Nogaret JM, Pienkowski T, Wardley A, Jakobsen EH, Price KN, Goldhirsch A. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol.* 2007;25:486-92.
19. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Therasse P, Palmer MJ, Pater JL. A randomized trial of



- letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:1793-802.
20. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, Calvo L, Carabantes F, Crespo C, Muñoz M, Llombart A, Plazaola A, Artells R, Gilabert M, Lloveras B, Alba E. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:811-6.
  21. Park IH, Lee YS, Lee KS, Kim SY, Hong SH, Jeong J, Lee H, Ro J, Nam BH. Single nucleotide polymorphisms of CYP19A1 predict clinical outcomes and adverse events associated with letrozole in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68:1263-71.
  22. Hadfield KD, Newman WG. Pharmacogenetics of aromatase inhibitors. *Pharmacogenomics.* 2012;13:699-707.
  23. Liu L, Bai YX, Zhou JH, Sun XW, Sui H, Zhang WJ, Yuan HH, Xie R, Wei XL, Zhang TT, Huang P, Li YJ, Wang JX, Zhao S, Zhang QY. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor, anastrozole, in metastatic breast carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2013;14:18973-88.
  24. Higgins JP, Green S. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*; 2011. [<http://www.cochrane-handbook.org>]. Accessed July 1, 2011].
  25. Thakkinstian A, McElduff P, D'Este C, Duffy D, Attia J. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med.* 2005;24:1291–306.
  26. Harris RJ, Bradburn MJ, Deeks JJ, Harbord RM, Altman DG, Sterne JAC. *Metan: fixed- and random-effects meta-analysis.* *STATA J.* 2008;1:3–28.
  27. Lunardi G, Piccioli P, Bruzzi P, Notaro R, Lastraioli S, Serra M, Marroni P, Bighin C, Mansutti M, Puglisi F, Porpiglia M, Ponzzone R, Bisagni G, Garrone O, Cavazzini G, Clavarezza M, Del Mastro L. Plasma estrone sulfate concentrations and genetic variation at the CYP19A1 locus in postmenopausal women with early breast cancer treated with letrozole. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137:167-74.

28. Kristensen VN, Sørli T, Geisler J, Yoshimura N, Linegjaerde OC, Glad I, Frigessi A, Harada N, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Effects of anastrozole on the intratumoral gene expression in locally advanced breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;95:105–11.
29. Gibson DA, McInnes KJ, Critchley HO, Saunders PT. Endometrial Intracrinology--generation of an estrogen-dominated microenvironment in the secretory phase of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1802-6.
30. Karpeta A, Barc J, Ptak A, Gregoraszczyk EL. The 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether hydroxylated metabolites 5-OH-BDE-47 and 6-OH-BDE-47 stimulate estradiol secretion in the ovary by activating aromatase expression. *Toxicology.* 2013;305:65-70.
31. Berstein L, Kovalevskij A, Zimarina T, Maximov S, Gershfeld E, Vasilyev D, Baisheva S, Baymakhasheva A, Thijssen JH. Aromatase and comparative response to its inhibitors in two types of endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;95:(1-5):71-4.
32. Wang L, Ellsworth KA, Moon I, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Martin YN, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler A, Suman VJ, Ravi S, Dixon JM, Miller WR, Wieben ED, Buzdar A, Weinshilboum RM, Ingle JN. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res.* 2010;70:319-28.
33. Ghimenti C, Mello-Grand M, Grosso E, Scatolini M, Regolo L, Zambelli A, Chiorino G. Regulation of aromatase expression in breast cancer treated with anastrozole neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med.* 2013;5:902-6.
34. Garcia-Casado Z, Guerrero-Zotano A, Llombart-Cussac A, Calatrava A, Fernandez-Serra A, Ruiz-Simon A, Gavila J, Climent MA, Almenar S, Cervera-Deval J, Campos J, Albaladejo CV, Llombart-Bosch A, Guillem V, Lopez-Guerrero JA. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene defines a subgroup of postmenopausal breast cancer patients with poor response to neoadjuvant letrozole. *BMC Cancer.* 2010;10:36.
35. Henry NL, Skaar TC, Dantzer J, Li L, Kidwell K, Gersch C, Nguyen AT, Rae JM, Desta Z, Oesterreich S, Philips S, Carpenter JS, Storniolo AM, Stearns V,

- Hayes DF, Flockhart DA. Genetic associations with toxicity-related discontinuation of aromatase inhibitor therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138:807-16.
36. Mao JJ, Su HI, Feng R, Donelson ML, Aplenc R, Rebbeck TR, Stanczyk F, DeMichele A. Association of functional polymorphisms in CYP19A1 with aromatase inhibitor associated arthralgia in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R8.37.
37. Napoli N, Rastelli A, Ma C, Yarramaneni J, Vattikutti S, Moskowitz G, Giri T, Mueller C, Kulkarny V, Qualls C, Ellis M, Armamento-Villareal R. Genetic polymorphism at Val80 (rs700518) of the CYP19A1 gene is associated with aromatase inhibitor associated bone loss in women with ER + breast cancer. *Bone.* 2013;55:309-14.
38. Fontein DB, Houtsma D, Nortier JW, Baak-Pablo RF, Kranenbarg EM, van der Straaten TR, Putter H, Seynaeve C, Gelderblom H, van de Velde CJ, Guchelaar HJ. Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144:599-606.
39. Miron L, Negură L, Peptanariu D, Marinca M. Research on aromatase gene (CYP19A1) polymorphisms as a predictor of endocrine therapy effectiveness in breast cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2012;116:997-1004.
40. Ferraldeschi R, Arnedos M, Hadfield KD, A'Hern R, Drury S, Wardley A, Howell A, Evans DG, Roberts SA, Smith I, Newman WG, Dowsett M. Polymorphisms of CYP19A1 and response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:1191-8.
41. Amir E, Seruga B, Niraula S, Carlsson L, Ocaña A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1299–309.
42. Crew KD, Greenlee H, Capodice J, Raptis G, Brafman L, Fuentes D, Sierra A, Hershman DL. Prevalence of joint symptoms in postmenopausal women taking aromatase inhibitors for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:3877-83.

43. Presant CA, Bosserman L, Young T, Vakil M, Horns R, Upadhyaya G, Ebrahimi B, Yeon C, Howard F. Aromatase inhibitor-associated arthralgia and/or bone pain: frequency and characterization in non-clinical trial patients. *Clin Breast Cancer*. 2007;7:775-8.
44. Henry NL, Giles JT, Stearns V. Aromatase inhibitor-associated musculoskeletal symptoms: etiology and strategies for management. *Oncology (Williston Park)*. 2008;22:1401-8.

### **Figure captions**

**Figure 1.** Flow diagram for article selection in the meta-analysis/systematic review.

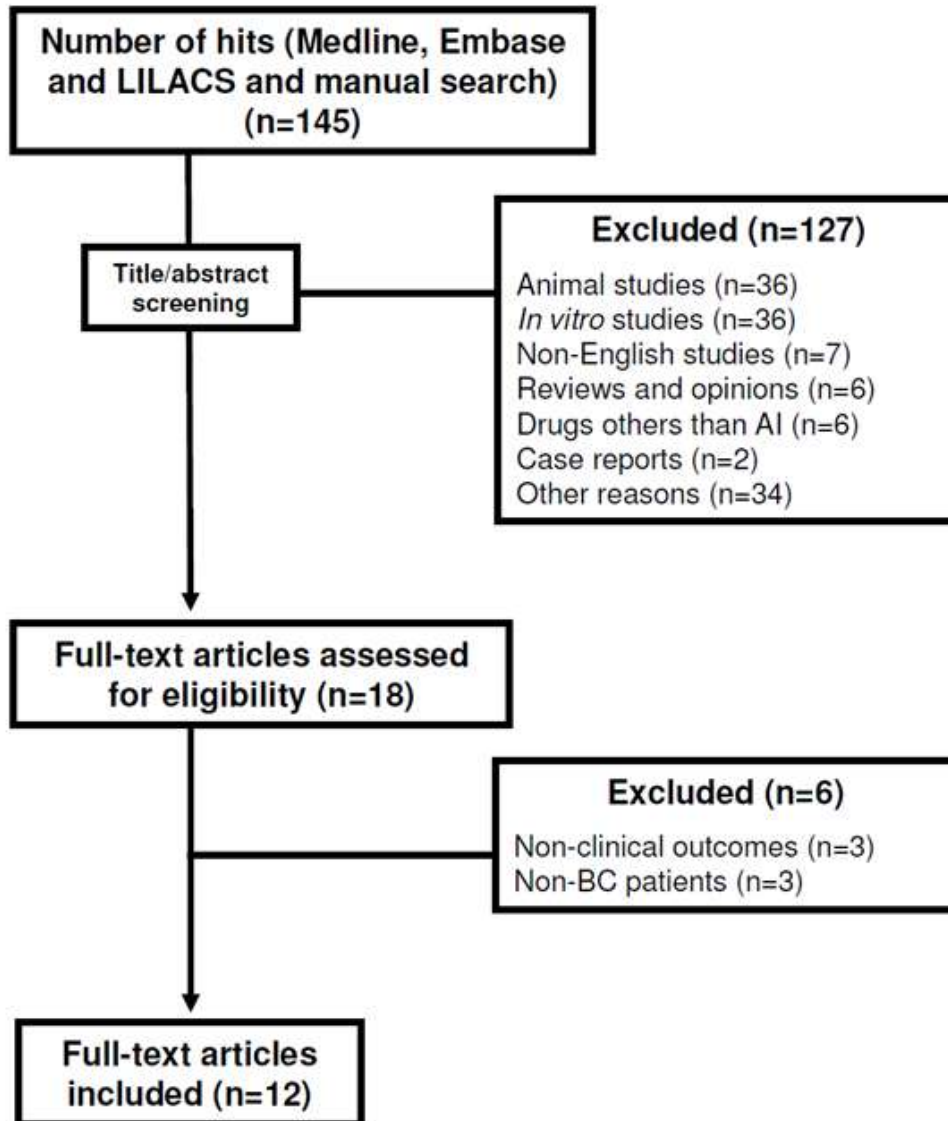
**Figure 2.** Forest plot showing the association of SNP rs4646 with TTP.

**Table 1.** Characteristics and methodological aspects of studies included in the meta-analysis/systematic review.

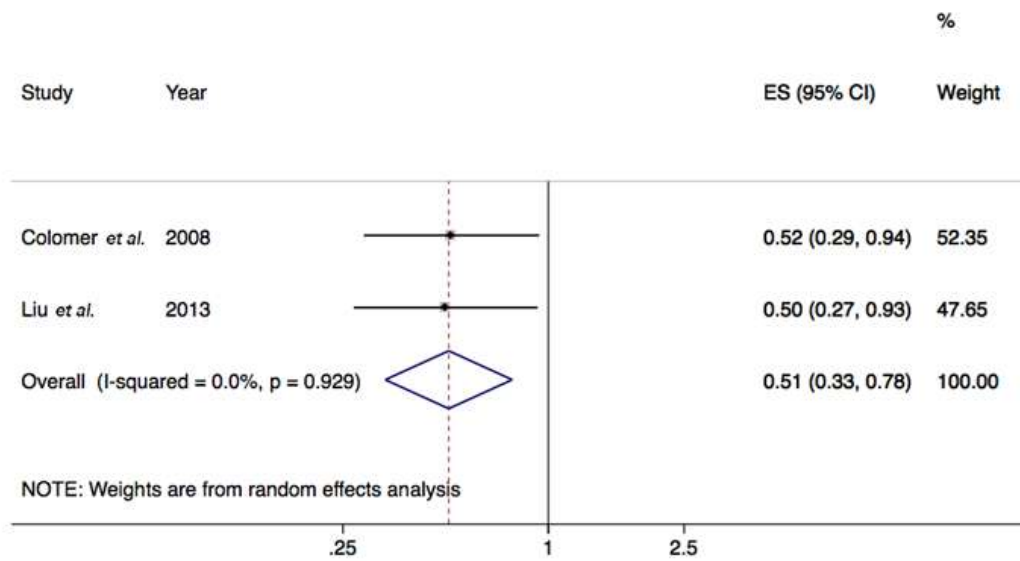
## FIGURES

**Figure 1.**

Flow diagram for articles selection in the meta-analysis/systematic review.



**Figure 2.** Forest plot showing the association of rs4646 with TTP.



## TABLES

**Table 1.**

Characteristics and methodological aspects of studies included in meta-analysis/ systematic review.

Study (year)	Country	Ethnicity	No. of patients	Clinical set	Menopausal status	Aromatase inhibitors	Main SNPs <sup>1</sup> /haplotypes (total analyzed)	Main outcomes <sup>2</sup>
Fontein et al (2014)	Netherlands	C	737	Adj	Post-menopausal	E	rs934635, rs1694189, rs7176005 (30)	AE (MS-AI, VMS)
Liu et al (2013)	China	As	272	ABC	NR	A	rs10046, rs4646 (2)	OS, TTP, AE
Miron et al (2012)	Italy	C	53	NR	NR	A, E, L	rs10046, rs4646, rs727479, rs700518 (4)	DFS, OS, TTP
Napoli et al (2013)	USA	C (80%), B (19%), As (1%)	101	BC Stage 0-III	Post-menopausal	A, E, L	rs4646, rs700518, rs1062033 (3)	AE (MS-AI)
Ghimenti et al (2013)	Italy	C	37	Neoadj	Post-menopausal	A	rs7176005, rs6493497 (2)	CR (RECIST)
Ferradelschi et al (2012)	UK	C (90%), others (10%)	308	ABC	NR	A, E, L	rs4775936, rs60271534, rs10459592, rs11636639, rs8039089 (56)	TTF
Park et al (2011)	Korea	As	109	ABC	Pre-/post-menopausal	L	rs700518, rs10459592, rs4775936 (46) * Haplotypes: M_1_3, M_2_1, M_3_5, M_5_3 (8)	CR (RECIST), TTP, AE (hot flashes), AE (MS-AI)
Mao et al (2011)	USA	C	390	Adjuvant BC Stage 0-III	Post-menopausal	A, E, L	rs749292, rs727479, rs10046, rs11575899, rs60271534 (5)	AE (MS-AI)
Garcia-Casado et al (2010)	Spain	C	95	Neoadj	Post-menopausal	L	rs10046, rs4646, rs700519 (3)	CR (WHO), PFS
Wang et al (2010)	USA, UK	C	45	Neoadj	NR	A, E, L	rs6493497, rs7176005 (48)	Tumor size
Colomer et al (2008)	Spain	C	67	ABC	Post-menopausal	L	rs10046, rs4646, rs727479 (3)	TTP, AE, CR (RECIST)
Henry et al (2013)	USA	C (88%), B (9%)	432	Adj	Post-menopausal	E, L	rs10046, rs1008805, rs10459592, rs1062033, rs11575899, rs2008691, rs2289105, rs2414096, rs28566535, rs28757184, rs3759811, rs4646, rs4774585, rs4775936, rs6493497, rs700518, rs7181886, rs727479, rs730154, rs749292, rs752760, rs936308, rs60271534 (23)	AE (MS-AI), treatment discontinuation

Abbreviations: A, Anastrozole; ABC, Advanced Breast Cancer; AE, adverse effects; As, Asian; B, Black; BC Stage 0-III, Breast Cancer stage 0-IIIa; C, Caucasian; CR (RECIST), clinical response by RECIST criteria; CR (WHO), clinical response by World Health Organization criteria; DFS, disease-free survival; E, exemestane; L, Letrozole; MS-AI, musculoskeletal symptoms related to aromatase inhibitors; NR - Not reported; OS, overall survival; PFS, progression free survival; SNPs, single-nucleotide polymorphisms; TTF, time to treatment failure; TTP, time to progression; UK, United Kingdom; USA, United States of America; VMS, vasomotor symptoms;

<sup>1</sup> main SNPs with statistically significant results discussed and analyzed in this study

<sup>2</sup> main outcomes selected for analysis in this study



## Capítulo V – Artigo 2

---

**Desfechos clínicos em mulheres com câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase estão associados a polimorfismos dos genes *CYP19A1* e *HSD17B1*.**

Artigo em elaboração

**Desfechos clínicos em mulheres com câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase estão associados a polimorfismos dos genes *CYP19A1* e *HSD17B1*.**

Oswaldo Artigalás<sup>1,2</sup> ([artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)), Mara Helena Hutz<sup>1</sup> ([mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)), Patrícia Ashton-Prolla<sup>1,3</sup> ([pprolla@gmail.com](mailto:pprolla@gmail.com)), José Pedrini<sup>4</sup> ([jose.pedrini@hotmail.com](mailto:jose.pedrini@hotmail.com)) Christina Oppermann<sup>5</sup> ([chrisopp@terra.com.br](mailto:chrisopp@terra.com.br)), Pedro Liedke<sup>6</sup> ([prliedke@gmail.com](mailto:prliedke@gmail.com)), Rodrigo Perez Pereira<sup>6</sup>, ([rpponcology@gmail.com](mailto:rpponcology@gmail.com)), Ida Vanessa Schwartz<sup>1,3</sup> ([idadschwartz@gmail.com](mailto:idadschwartz@gmail.com)).

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. <sup>2</sup> Unidade de Genética, Hospital da Criança Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brasil. <sup>3</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil. <sup>4</sup> Serviço de Mastologia, Hospital Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brasil. <sup>5</sup> Serviço de Oncologia, Hospital Femina, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brasil. <sup>6</sup> Serviço de Oncologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

**Autor correspondente:** Oswaldo Artigalás. UFRGS - Campus do Vale - Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M CEP:91501-970 - Caixa Postal 15053 - Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: 55-51-33086722. Email: [artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** Genes relacionados com o metabolismo do estrogênio (*CYP19A1*, *ESR1* e *HSD17B1*) e o gene *TCL1A* desempenham um papel crítico no metabolismo dos estrogênios. No entanto, pouco se sabe sobre a associação entre polimorfismos desses genes e a eficácia dos inibidores da aromatase (IA). O objetivo do nosso estudo foi investigar o impacto de polimorfismos desses genes na resposta clínica aos IA. **Material e métodos:** Cento e noventa mulheres provenientes de três hospitais com diagnóstico de câncer de mama receptor-hormonal positivo tratadas com IA de terceira geração foram identificadas e o seu DNA genômico foi extraído a partir de amostras de saliva. Foram genotipados 14 variantes em 4 genes candidatos (*CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B1* e *TCL1A*). Os desfechos clínicos foram coletados de forma retrospectiva até a entrada no estudo, e prospectivamente no seguimento de 12 meses. **Resultados:** O rs2830 foi associado a menores índices de remissão, com uma redução de aproximadamente 54% no risco de remissão em mulheres homocigotas (OR=0,46; IC 95%= 0,22-0,93),  $p=0,032$ . O SNP rs7176005 foi associado a menor ocorrência de sobrevida livre de doença quando em homocigose, mesmo após o ajuste por positividade para HER2, radioterapia adjuvante e outras doenças pregressas (OR= 0,42; IC95%= 0,18-0,94,  $p=0,036$ ). O rs700519 apresentou associação estatisticamente significativa confirmada após regressão logística multivariada ( $p=0,041$ ), quando se verificou que homocigotas apresentam um risco de quase cinco vezes maior de sobrevida livre de doença (OR= 4,95, IC 95%= 1,01-35,4). **Conclusões:** Nosso estudo revelou que os rs2830 no gene *HSD17B1* e os rs7176005 e rs700519 no gene *CYP19A1* estão associados significativamente a resposta clínica aos IA em mulheres com câncer de mama receptor hormonal-positivo. Ainda que futuros estudos sobre SNPs associados a variações nas respostas ao tratamento endócrino sejam necessários, essa pode se tornar uma ferramenta útil para orientar o tratamento nessas pacientes.

**Palavras-chave:** Inibidores da aromatase, câncer de mama, *CYP19A1*, *HSD17B1*, farmacogenética, desfechos clínicos.

## 1. INTRODUÇÃO

Em todo mundo, o câncer de mama (CM) é um dos tipos mais comuns de neoplasia, sendo a principal causa de morte em mulheres, com um total estimado de mais de 1,5 milhões de diagnósticos e uma mortalidade superior a 500.000 óbitos em mulheres no ano de 2012 (GLOBOCAN, 2012). Nos países em desenvolvimento, o CM substituiu o câncer cervical como a principal causa de morte por câncer entre as mulheres [Jemal et al, 2011; Parkin et al, 2005]. A principal característica biológica do CM é que mais de dois terços dos casos expressam receptores hormonais (RH), seja de estrogênio e/ou progesterona [Bulun et al, 2005; Toniolo et al, 1995], sendo a manipulação endócrina uma opção de tratamento eficaz para essas pacientes. O tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), tem sido há décadas a terapia padrão em pacientes com CM RH-positivo [EBCTCG et al, 2011; Davies et al, 2012].

No entanto, a terceira geração de inibidores da aromatase (IA) (como letrozol, anastrozol e exemestano) tem demonstrado ser mais eficaz do que o tamoxifeno [Lønning e Eikesdal HP, 2013], tornando-se atualmente o tratamento endócrino adjuvante padrão para mulheres pós-menopáusicas com CM RH-positivo. Uma recente meta-análise não encontrou nenhuma diferença na eficácia anti-tumoral entre estes três IA [Dowsett et al, 2010].

A aromatização periférica dos andrógenos é a principal fonte de estrogênios endógenos em mulheres na pós-menopausa [Geisler e Lønning, 2005], sendo que os IA se caracterizam pela potente inibição da aromatase, o que causa até 99% de inibição na síntese de estrogênio *in vivo* [Geisler et al, 1998; Geisler et al, 2002]. O gene *CYP19A1* codifica a proteína aromatase (citocromo P-450, da família 19, subfamília A, polipeptídeo 1; 15q21.1) [Bulun et al, 2003], além disso dentro dessa rota metabólica são necessárias diferentes proteínas, como as codificadas pelos genes *ESR1* e *HSD17B1*, que estão envolvidas na síntese e no mecanismo de ação dos estrógenos. Vários trabalhos têm demonstrado que polimorfismos do gene *CYP19A1* estão significativamente associados com diferentes níveis de estrogênios circulantes [Haiman et al, 2007; Dunning et al, 2004] e, mais recentemente, tem sido sugerido que polimorfismos específicos

podem ser marcadores clínicos preditivos da eficácia do tratamento com IA em pacientes com CM [Abubakar et al, 2014]. Embora muitos estudos tenham avaliado polimorfismos de *CYP19A1* em relação ao risco de câncer de mama em mulheres saudáveis com diversas variantes do gene já tendo sido associadas a um menor risco de câncer [Pineda et al, 2013], até o momento poucos estudos abordaram as possíveis relações entre esses polimorfismos e o prognóstico de pacientes com CM ou com a eficácia do tratamento com IA. Colomer et al (2008) relataram que em mulheres pós-menopáusicas com CM metastático tratadas com letrozol, o tempo de progressão (TTP) foi significativamente mais prolongado em pacientes com o alelo T do rs4646 quando comparadas com as homozigotas para a variante de tipo selvagem (G/G); no entanto, em outro estudo [Garcia-Casado et al, 2010], as mesmas variantes (G/T e T/T) foram associadas com um menor benefício clínico (menor sobrevida livre de progressão), em um cenário neoadjuvante. Mesmo assim, Liu et al (2013) verificaram que alelos variantes rs4646 foram significativamente associados com maior sobrevida global em pacientes com CM metastático.

No presente estudo, o objetivo foi realizar uma análise farmacogenética de oito polimorfismos do gene *CYP19A1*, dois polimorfismos dos genes *ESR1*, *HSD17B1* e *TCL1A* em uma série de mulheres com CM RH-positivo tratadas com IA de terceira geração e descrever a sua relação com desfechos clínicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Delineamento do estudo e população amostral**

Pacientes com câncer de mama com receptor de estrogênio (RE) e/ou progesterona receptor (RP) positivo, provenientes dos três principais hospitais públicos universitários da cidade de Porto Alegre, Brasil: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital Conceição (GHC) e Hospital Femina (HFE) foram identificadas e incluídas no estudo. Os critérios de inclusão foram: ter recebido tratamento com IA de terceira geração (anastrozol, letrozol ou exemestano - IA) por pelo menos 4 semanas como primeira linha ou em esquema *switch* após tamoxifeno e ter pelo menos 18 anos idade.

Os dados clínicos foram coletados de forma retrospectiva da data de início do tratamento até a inclusão no estudo, e prospectivamente por 12 meses após a inclusão no estudo (coleta de DNA), por meio de revisão dos prontuários e questionário direto aplicado às pacientes. O estudo foi revisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das três instituições participantes do estudo (HCPA, GHC, and HFE).

### **Extração de DNA**

O DNA foi obtido de amostras de saliva coletadas no momento da inclusão do estudo, usando o Oragene DNA Sample Collection Kit (OG-250, Disc Format, DNA Self-Collection Kit, Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). O DNA foi extraído dentro do prazo de 6 meses a partir da coleta da amostra, e a extração foi realizada usando o volume padrão de 2.0 mL da solução Oragene-DNA/saliva, de acordo com o protocolo de fabricante. Verificou-se que a coleta de saliva usando o kit Oragene durante o trabalho de campo permitiu rendimentos elevados de DNA e gerou DNA com qualidade adequada para os estudos genéticos necessários, como já anteriormente descritos [Nunes et al, 2012].

### **Medida dos desfechos**

Os desfechos foram aferidos de forma direta via registros médicos após um período de seguimento de 12 meses, sendo agrupados em: (1) remissão, quando a paciente completou (após o seguimento de 12 meses) um período superior a 60 meses desde o diagnóstico sem sinais de doença; (2) recidiva, quando a paciente apresentou sinais de metástases (local ou sistêmica) no período de 12 meses do estudo; (3) sobrevida livre de doença, quando a paciente não apresentou sinais de recidiva ou progressão da doença ao longo do estudo, mas não completou mais de 60 meses após o diagnóstico; (4) óbito, quando a paciente faleceu durante o período de 12 meses de seguimento do estudo. Múltiplas co-variáveis foram acessadas, sendo as variáveis demográficas (idade, etnia, anos de estudo, data da última menstruação e motivo da menopausa) auto-relatadas pelas pacientes. As variáveis clínicas, tais como o estágio do câncer, a quimioterapia prévia, uso de inibidores da aromatase atual e tempo desde o início IA, foram

obtidas por verificação nos registros médicos hospitalares e por entrevista às pacientes.

### **Seleção dos polimorfismos e genotipagem**

*Tagging*-SNPs foram selecionados para busca por variantes genéticas comuns do gene *CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B1* e *TCL1A* com base em informações de desequilíbrio de ligação disponíveis no International *HapMap Project* (National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.hapmap.org>), e usando o algoritmo Haploview, com SNPs com uma frequência do alelo menor (MAF)  $\geq 5\%$  no grupo étnico *Utah residents with ancestry from northern and western Europe* (CEU), já que trabalhos anteriores demonstraram ser esse o grupo a ter maior similaridade genética com a população do nosso estudo [Pena et al, 2011]. Além disso, também foi realizada uma revisão detalhada da literatura com vistas a priorizar SNPs que possuíssem impacto funcional sobre a expressão do gene ou atividade da enzima, ou que já tivessem sido reportados com associação a desfechos clínicos relacionados ao uso de IA no câncer de mama. Dessa forma, foram incluídos 8 SNPs do gene *CYP19A1* (rs700518, rs4775936, rs4646, rs10459592, rs6493497, rs7176005, rs10046, rs700519). Os outros SNPs incluídos foram selecionados a partir de genes que codificam produtos que estão envolvidas na via metabólica dos estrógenos e/ou vias correlacionadas, sendo escolhidos 2 SNPs no gene do receptor de estrogênio (*ESR1*), dois SNPs no gene da enzima 17-beta-hidroxiesteroide desidrogenase 1 (*HSD17B1*) e dois SNPs no gene T-cell leukemia/lymphoma 1A (*TCL1A*).

A equipe laboratorial estava cegada para todos os dados clínicos e demais desfechos, realizando a genotipagem por discriminação alélica usando ensaios *TaqMan SNP Genotyping* específicos e seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR foram lidas no *7500 Fast Real Time PCR System in endpoint mode* usando o *Allelic Discrimination Sequence Detector software* (Applied Biosystems).

### **Validação da genotipagem**

Amostras cujo ensaio falhou foram retestadas pelo menos mais uma vez na mesma plataforma e foram consideradas perdidas se a genotipagem falhou pela segunda vez. Caso houvesse mais de 10 falhas de genotipagem em um mesmo paciente, este seria excluído. A taxa média de sucesso dos demais ensaios, bem como das amostras individualmente foi >95%. Não foram observadas outras inconsistências.

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Cinco SNPs: rs700519, rs 7176005, 6493497 (*CYP19A1*), rs2830 (*HSD17B1*) e rs11849538 (*TCL1A*) foram associados a diferentes desfechos clínicos no modelo sobre-dominante (“*over-dominant model*”). Foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), para comparação da ocorrência de desfechos clínicos versus sua não-ocorrência para diferentes genótipos de comparação. Posteriormente, foi realizada análise de regressão logística univariada e multivariada para ocorrência dos diferentes desfechos clínicos com relação às variantes genéticas *CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B1* e *TCL1A*, cujos resultados haviam sido significativos na primeira análise por qui-quadrado. Para inclusão do modelo univariado, foram consideradas as variáveis com  $p < 0,10$ . As análises de regressão logística multivariada foram ajustadas para idade e idade ao diagnóstico, quimioterapia e radioterapia adjuvante, ocorrência de metástases, linfonodos comprometidos, grau e tipo histológico, doenças prévias, etnia, e positividade para HER2. Devido à natureza exploratória dessas análises, que compreende testes de múltiplas hipóteses e que posteriormente exigirão uma investigação mais aprofundada, nós não corrigimos para múltiplos testes (Goeman e Solari, 2011).

## **3. RESULTADOS**

A coleta de dados clínicos completos de forma retrospectiva e posteriormente aos 12 meses de seguimento foi possível em 190 pacientes, de



um total de 204 amostras coletadas (Figura 1). Nessas pacientes, foi possível a realização de análises genéticas de 14 polimorfismos (SNPs, “*single nucleotide polymorphisms*”). A média de idade de 68,3 anos (DP=10,3 anos), sendo todas as pacientes provenientes do estado do Rio Grande do Sul, no extremo sul do Brasil (n=190). A média de idade ao diagnóstico foi de 58,6 anos (DP=11,1), com média de idade de menopausa aos 47,1 anos (DP=7,2). O tempo médio de uso de inibidores da aromatase foi de 35,7 meses (DP=18,2 meses), com um tempo mínimo de uso de 3,1 meses e máximo de 109,5 meses. Maiores detalhamentos das características das pacientes incluídas estão descritas na Tabela 1.

As frequências alélicas de todos os 14 SNPs incluídos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

O teste qui-quadrado identificou que os homozigotos no SNPs rs700519 (*CYP19A1*) tem menor índice de remissão (p=0,10), assim como no rs2830 (*HSD17B1*) (p=0,05). Os homozigotos para os SNPs rs7176005 e rs6493497 (*CYP19A1*) tiveram maior índice de recidiva da doença (p=0,01 e p=0,06, respectivamente), assim como os homozigotos para os rs700519 (*CYP19A1*) e rs11849538 (*TCL1A*) tiveram maior ocorrência de tempo livre de doença (p=0,04 e p=0,02, respectivamente), enquanto que homozigotos para o rs7176005 tiveram esse desfecho reduzido (p=0,10).

Na análise por regressão logística univariada, o efeito do rs700519 sobre a remissão não se confirmou (OR=0,19; IC 95%= 0,01-1,05; p=0,059), mas encontramos uma forte associação entre o rs2830 e menores índices de remissão (OR=0,52; IC 95%= 0,28-0,95; p=0,035). Esse último resultado foi confirmado na regressão logística multivariada, controlando por para HER2 positivo, radioterapia adjuvante e outras doenças progressas, com uma redução de aproximadamente 54% no risco de remissão em homozigotos para o rs2830 (OR=0,46; IC 95%= 0,22-0,93), p=0,032 (Tabela 2). A ocorrência de recidiva teve associação estatisticamente significativa por regressão logística univariada, com relação aos rs7176005 e rs6493497 (*CYP19A1*), p=0,009 e p=0,043 respectivamente. No entanto, esse maior índice de recidiva em homozigotos para esses polimorfismos (rs7176005 e rs6493497) não se confirmou quando controlados por presença prévia de metástases e quimioterapia adjuvante (Tabela 2). Pacientes

homozigotas para o SNP rs7176005 tiveram menor ocorrência de sobrevida livre de doença, quando comparadas às heterozigotas, mesmo após o ajuste por positividade para HER2, radioterapia adjuvante e outras doenças pregressas (OR= 0,42; IC95%= 0,18-0,94, p=0,036). Esse desfecho, no entanto, não apresentou significância estatística quando associado ao rs11849538 (*TCL1A*) quando submetido à regressão logística multivariada (OR=2,32, IC95%= 0,93-6,04, p=0,07). O rs700519 apresentou associação estatisticamente significativa confirmada após regressão logística multivariada (p=0,041), quando se verificou que homozigotas apresentam um risco de quase cinco vezes maior de sobrevida livre de doença (OR= 4,95, IC 95%= 1,01-35,4), quando comparadas as heterozigotas para esse polimorfismo (Tabela 2).

#### 4. DISCUSSÃO

Nossas análises sugerem a associação de três variantes genéticas em genes do metabolismo dos inibidores da aromatase com a eficácia clínica dessas medicações no tratamento de mulheres com câncer de mama RH-positivo. Em um total de 190 pacientes analisadas, os rs700519 e 7176005 do gene *CYP19A1* e o rs2830 do gene *HSD17B1*, dentro de um total de 14 SNPs em 4 genes diferentes estudados, mostraram-se estar associados a variabilidade de eficácia clínica.

Alguns estudos prévios como de Colomer et al (2008) já haviam relatado a associação entre variantes genéticas (rs4646) e um aumento no tempo de progressão da doença ("*time-to-progression*", TTP) em mulheres com CM tratadas com letrozol, resultados que vão ao encontro dos obtidos por Liu et al (2013), que encontraram associação entre o rs4646 e maior TTP (p=0,049). No entanto, Liu et al (2013) não identificaram o mesmo tipo de associação com os rs10046, rs2830, rs9926298 e rs9939609, os dois primeiros também analisados em nossa amostra. Ainda que os desfechos estudados por nós e pelo grupo de Liu sejam diferentes, em nosso trabalho o rs2830 mostrou-se associado a um menor índice de remissão, indicando que variantes nesse gene podem estar associadas a uma menor taxa de resposta ao tratamento com IA. Esse dado é completamente novo

na literatura, já que não encontramos nenhum outro trabalho, indicando que esse SNPs esteja associado a variação de eficácia dos IA no câncer de mama.

Outros estudos como de Park et al (2011) encontraram associação entre benefício clínico com uso de letrozol e os rs700518, rs10459592 e rs4775936; os quais também analisados em nossa amostra não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Similarmente, Wang et al. (2010) descreveram a ausência de qualquer associação ( $p>0.05$ ) entre 48 SNPs (incluindo rs6493497 e rs7176005) analisados e a resposta clínica dos IA em neoadjuvância em mulheres com câncer de mama. Outro trabalho (Ghimenti et al, 2013), que considerou resposta clínica ao anastrozol uma redução de  $>30\%$  do volume tumoral do câncer de mama, não encontrou associação estatisticamente significativa com os SNPs rs6493497 e rs7176005, também no cenário neoadjuvante. Aqui, , apesar do contexto clínico diferente, alguns resultados encaminham-se para mesma direção, já que também não foi identificada associação com rs6493497 e os diferentes desfechos clínicos analisados, sugerindo que esse polimorfismo não interfere na resposta aos IA. No entanto, no que se refere ao rs7176005, encontramos que mulheres homozigotas para esse polimorfismo parecem apresentar um risco menor de sobrevida livre doença, sugerindo que esse SNP possa estar relacionado a desfechos desfavoráveis em relação ao tratamento com IA. Ambos, rs7176005 e rs6493497 estão localizados na região flaqueadora 5' do exon I.1 do *CYP19A1* afetando a atividade transcricional no tecido tumoral, modulando a atividade enzimática da aromatase e assim aumentando os níveis de estrógenos (Wang et al, 2010). Isso sugere fortemente que essas variantes genéticas, por modular os níveis hormonais, tenham efeitos sobre a eficácia clínica dos IA, algo reforçado pelos resultados de outro trabalho que também associou o rs7176005 a um aumento nos níveis transcricionais em mulheres com CM, resultando possivelmente em aumento nos níveis plasmáticos e teciduais de estrógenos (Straume et al, 2012). O efeito do tratamento com IA pode, nesse caso, ser influenciado pelos níveis basais de estrógenos.

O rs11849538 do gene *TCL1A* foi associado nas análises univariadas com sobrevida livre de doença, mas o efeito não manteve significância quando controlado por outras variáveis ( $p=0,070$ ). Apesar de nosso trabalho não ter

encontrado significância estatística, é possível que essa variante possa ter efeito em contexto clínico mais limitado ou em outra população maior, já que a mesma já apresentou efeito funcional através da criação de um elemento de resposta ao estrogênio demonstrado por ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) (Ingle et al, 2010).

Assim nesse estudo, encontramos associação entre variantes genéticas nos genes *CYP19A1* (rs7176005 e rs700519) e *HSD17B1* (rs2830) e a eficácia clínica dos IA em mulheres brasileiras com CM. Esse foi o primeiro estudo realizado na população brasileira, com resultados que permitem especulações de que genes envolvidos na rota metabólica dos estrógenos possam estar associados a variabilidade nos desfechos clínicos do tratamento com IA. Esse resultado é um primeiro passo para o uso de ferramentas laboratoriais para a individualização da terapia adjuvante endócrina em pacientes com CM. Claramente, futuros estudos sobre SNPs associados a variações nas respostas ao tratamento endócrino são necessários para confirmar esses achados na população brasileira e terão de ser realizados em grupos cada vez maiores de pacientes, no intuito de buscar melhores estratégias de tratamento em pacientes candidatas a hormonioterapia.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## **AGRADECIMENTOS**

Nós somos gratos ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS), ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## REFERÊNCIAS

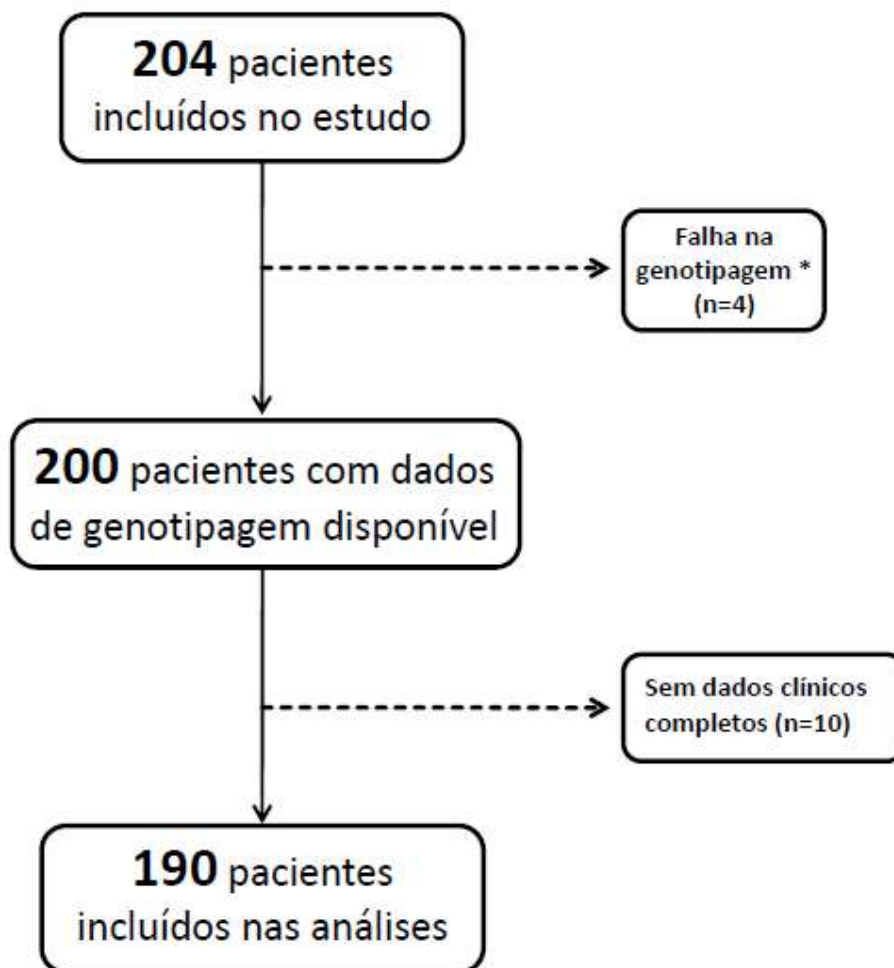
1. Abubakar MB, Wei K, Gan SH. The influence of genetic polymorphisms on the efficacy and side effects of anastrozole in postmenopausal breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Dec;24(12):575-81.
2. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, et al: Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005, 57(3):359-383.
3. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 86:219-24.
4. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, Calvo L, Carabantes F, Crespo C, Muñoz M, Llombart A, Plazaola A, Artells R, Gilabert M, Lloveras B, Alba E: A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008, 14:811-816.
5. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R et al. (2012) Longterm effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet Publishing House*.
6. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, Buyse M, Baum M, Buzdar A, Colleoni M. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28: 509–518.
7. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96:936–945.
8. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M et al. (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378: (9793):771-84
9. Garcia-Casado Z, Guerrero-Zotano A, Llombart-Cussac A, Calatrava A, Fernandez-Serra A, Ruiz-Simon A, Gavila J, Climent MA, Almenar S, Cervera-Deval J, Campos J, Albaladejo CV, Llombart-Bosch A, Guillem V, Lopez-Guerrero JA: A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene defines a subgroup of postmenopausal breast cancer patients with poor response to neoadjuvant letrozole. *BMC Cancer* 2010, 10:36.

10. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE: Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 2002, 20(3):751-757.
11. Geisler J, King N, Anker G, Ornati G, Di Salle E, Lønning PE & Dowsett M: In vivo inhibition of aromatization by exemestane, a novel irreversible aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 1998, 4:2089–2093.
12. Geisler J, Lønning PE. Aromatase inhibition: translation into a successful therapeutic approach. *Clinical Cancer Research* 2005, 11:2809–2821.
13. Ghimenti C, Mello-Grand M, Grosso E, Scatolini M, Regolo L, Zambelli A, Chiorino G. Regulation of aromatase expression in breast cancer treated with anastrozole neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med.* 2013;5:902-6.
14. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012; 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> [Accessed 2 December 2014]
15. Goeman J, Solari A. Multiple Testing for exploratory Research. *Stat Sci* 2011, 26:584–597.
16. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res* 2007, 67:1893–1897.
17. Ingle JN. Genome-wide case-control study of musculoskeletal adverse events and functional genomics in women receiving aromatase inhibitors: going beyond associations. *Breast Cancer Res.* 2010 Dec 20;12 Suppl 4:S17.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61:69-90.
19. Liu L, Bai YX, Zhou JH, Sun XW, Sui H, Zhang WJ, Yuan HH, Xie R, Wei XL, Zhang TT, Huang P, Li YJ, Wang JX, Zhao S, Zhang QY. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor, anastrozole, in metastatic breast carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2013;14:18973-88.
20. Lønning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jun 24;20(4):R183-201.
21. Nunes AP, Oliveira IO, Santos BR, Millech C, Silva LP, González DA, Hallal PC, Menezes AM, Araújo CL, Barros FC. Quality of DNA extracted from saliva

- samples collected with the Oragene™ DNA self-collection kit. *BMC Med Res Methodol* 2012, 4;12:65.
22. Park IH, Lee YS, Lee KS, Kim SY, Hong SH, Jeong J, Lee H, Ro J, Nam BH. Single nucleotide polymorphisms of CYP19A1 predict clinical outcomes and adverse events associated with letrozole in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68:1263-71.
  23. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74–108.
  24. Pineda B, García-Pérez MÁ, Cano A, Lluch A, Eroles P. Associations between aromatase CYP19 rs10046 polymorphism and breast cancer risk: from a case-control to a meta-analysis of 20,098 subjects. *PLoS One.* 2013; 8:e53902.
  25. Straume AH, Knappskog S, Lønning PE. Effect of CYP19 rs6493497 and rs7176005 haplotype status on in vivo aromatase transcription, plasma and tissue estrogen levels in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012 Jan;128(1-2):69-75.
  26. Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS: A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(3):190-197.
  27. Wang L, Ellsworth KA, Moon I, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Martin YN, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler A, Suman VJ, Ravi S, Dixon JM, Miller WR, Wieben ED, Buzdar A, Weinshilboum RM, Ingle JN. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res.* 2010;70:319-28.

## FIGURAS

**Figura 1.** Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo.



\* Quando houve falha na genotipagem, a amostra foi retestada uma segunda vez na mesma plataforma e considerada falha se o resultado insuficiente se repetiu novamente. A amostra também foi excluída quando os resultados foram insuficientes em mais de 50% of the SNPs testados.



**Tabela 1.** Características de base das pacientes incluídas nas analyses.

<b>Características de base</b>	<b>n</b>	<b>percentual</b>
<b>Idade (anos)</b>		
≤59	63	33,2
60-69	65	34,2
≥70	62	32,6
<b>Menopausa</b>		
Pré-menopáusicas	25	13,2
Pós-menopáusicas	141	74,2
Sem informação	24	12,6
<b>Self-reported color</b>		
Branco	168	88,4
Negro	11	5,8
Pardo	3	1,6
Não informado	8	4,2
<b>Receptores de estrogênio</b>		
Positivo	182	95,8
Negativo	6	3,2
Sem informação	2	1,1
<b>Receptores de progesterone</b>		
Positivo	156	82,1
Negativo	29	15,3
Sem informação	5	2,6
<b>HER2</b>		
Positivo	34	17,9
Negativo	124	65,3
Sem informação	32	16,8
<b>Grau tumoral</b>		
I	20	10,5
II	79	41,6
III	37	19,5
Sem informação	54	28,4
<b>Tipo histológico</b>		
Carcinoma ductal invasor	148	77,9
Carcinoma lobular invasor	24	12,6
Outros	5	2,6
Sem informação	13	6,8
<b>Metástases</b>		
Sim	17	8,9
Não	115	60,5
Não informado	58	30,5
<b>Tipo de inibidor da aromatase</b>		
Anastrozol	133	70,0
Letrozol	41	21,6
Exemestano	16	8,4
<b>Radioterapia adjuvante</b>		
Sim	135	71,1

Não	49	25,8
Não informado	6	3,2
<b>Quimioterapia adjuvante</b>		
Sim	92	48,4
Não	86	45,3
Nã informado	12	6,3
<b>Cirurgia</b>		
Mastectomia	75	39,5
Excisão local (e.g setorectomia)	113	59,5
Sem ressecção	2	1,1
<b>Eventos adversos (EAs)</b>		
<b>EA musculoesqueléticos</b>		
Sim	134	70,5
Não	56	29,5
<b>Sintomas vasomotores</b>		
Sim	93	48,9
Não	97	51,1
<b>Outros EA</b>		
Sim	138	72,6
Não	52	27,4

**Tabela 2.** Frequência genótípicas e alélicas dos rs701519, rs2830, rs7176005, rs6493497 e rs11849538, e Odds Ratios (OR) para remissão, recidiva e sobrevida livre de doença do tratamento com inibidores da aromatase por genótipo.

SNP ( <i>Gene</i> )	Remissão		<i>p</i> *	Reg.Log. Univariada		Reg.Log. Multivariada <sup>(1)</sup>	
	Sim (%)	Não (%)		OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
<b>rs700519 (<i>CYP19A1</i>)</b>							
CC or TT	66 (34,7)	114 (60)	0,10	0,19 (0,01-1,05)	0,059	0,24 (0,01-1,53)	0,146
CT	1 (0,6)	9 (4,7)		Referência		Referência	
<b>rs2830 (<i>HSD17B1</i>)</b>							
AA or GG	39 (20,5)	52 (27,4)	0,05	0,52 (0,28-0,95)	0,035	0,46 (0,22-0,93)	0,032
AG	71 (37,4)	28 (14,7)		Referência		Referência	
SNP ( <i>Gene</i> )	Recidiva		<i>p</i> *	Reg.Log. Univariada		Reg.Log. Multivariada <sup>(2)</sup>	
rs7176005 ( <i>CYP19A1</i> )	Sim (%)	Não (%)		OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC or TT	24 (12,6)	118 (62,1)	0,01	2,69 (1,28-5,63)	0,009	2,14 (0,79-5,74)	0,132
CT	17 (8,9)	31 (16,3)		Referência		Referência	
<b>rs6493497 (<i>CYP19A1</i>)</b>							
AA or GG	26 (13,7)	118 (62,1)	0,06	2,19 (1,02-4,62)	0,043	1,42 (0,49-3,87)	0,499
AG	15 (7,9)	31 (16,3)		Referência		Referência	
SNP ( <i>Gene</i> )	Sobrevida livre de doença		<i>p</i> *	Reg.Log. Univariada		Reg.Log. Multivariada <sup>(1)</sup>	
rs7176005 ( <i>CYP19A1</i> )	Sim (%)	Não (%)		OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC or TT	59 (31,1)	83 (43,7)	0,10	0,52 (0,24-1,05)	0,069	0,42 (0,18-0,94)	0,036
CT	13 (6,8)	35 (18,4)		Referência		Referência	
<b>rs700519 (<i>CYP19A1</i>)</b>							
CC or TT	65 (34,2)	115 (60,5)	0,04	4,12 (1,11-19,65)	0,034	4,95 (1,01-35,4)	0,041
CT	7 (3,7)	3 (1,6)		Referência		Referência	
<b>rs11849538 (<i>TCL1A</i>)</b>							
CC or GG	55 (28,9)	106 (55,8)	0,02	2,73 (1,22-6,25)	0,014	2,32 (0,93-6,04)	0,07
CG	17 (8,9)	12 (6,3)		Referência		Referência	

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança.

\* Análise em duas-vias ("Two-way analysis") (homozigotos vs. heterozigotos).

(1) Ajustado individualmente por positividade de HER2, radioterapia adjuvante e outras doenças progressas.

(2) Ajustado individualmente por metástases e quimioterapia adjuvante.

## Capítulo VI – Artigo 3

---

**Genetic variants are associated with adverse effects in women with breast cancer treated with aromatase inhibitors.**

Artigo em elaboração

**Genetic variants are associated with adverse effects in women with breast cancer treated with aromatase inhibitors.**

Oswaldo Artigalás<sup>1,2</sup> ([artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)), Mara Helena Hutz<sup>1</sup> ([mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)), José Pedrini<sup>3</sup> ([jose.pedrini@hotmail.com](mailto:jose.pedrini@hotmail.com)), Christina Oppermañ<sup>4</sup> ([chrisopp@terra.com.br](mailto:chrisopp@terra.com.br)), Pedro Liedke<sup>5</sup> ([prliedke@gmail.com](mailto:prliedke@gmail.com)), Rodrigo Perez Pereira<sup>5</sup> ([rpponcology@gmail.com](mailto:rpponcology@gmail.com)), Patricia Ashton-Prolla<sup>1,6</sup> ([pprolla@gmail.com](mailto:pprolla@gmail.com)), Ida Vanessa Schwartz<sup>1,6</sup> ([idadschwartz@gmail.com](mailto:idadschwartz@gmail.com)).

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. <sup>2</sup>Genetics Unit, Children's Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil. <sup>3</sup>Mastology Service, Conceição Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil. <sup>4</sup>Oncology Service, Femina Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil. <sup>5</sup>Oncology Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. <sup>6</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Oswaldo Artigalás. UFRGS - Campus do Vale - Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M CEP:91501-970 - Caixa Postal 15053 - Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: 55-51-33086722. Email: [artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)

## Abstract

**Introduction:** Aromatase inhibitors (AIs) have become the first-line drugs of choice for treatment of hormone receptor-positive (HR+) breast cancer; however, this drug class is associated with a series of adverse effects (AEs), particularly musculoskeletal adverse events (MSAEs) and vasomotor symptoms (VMSs), which often interfere with treatment adherence. Occurrence of these events appears to be related to variants of genes involved in AI metabolism. The present study investigated the relationship between the aforementioned AEs and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CYP19A1*, *ESR1*, *TCL1A*, and *HSD17B1* genes in women with breast cancer treated with AIs. **Materials and Methods:** Genomic DNA was obtained from the saliva of 190 women treated with AIs and genotyped for 10 SNPs in the *CYP19A1* gene and two SNPs in genes *ESR1*, *TCL1A*, and *HSD17B1*. Haplotype analysis was performed for all genes of interest. Clinical data on AI treatment-emergent adverse effects were collected and later analyzed in relation to genotype findings. **Results:** In the 190 women analyzed, VMSs were associated with the homozygous TT genotype of rs7176005 ( $p=0.038$ ). Furthermore, the GG genotypes of *CYP19A1* polymorphism rs10046 and of *HSD17B1* polymorphism rs2830 were associated with lower rates of joint dysfunction ( $p=0.002$ ) and osteoporosis ( $p=0.042$ ) respectively. The occurrence of MSAEs was associated with STR rs60271534; presence of the 6- and 10-repeat alleles was associated with a higher rate of these symptoms ( $p=0.001$ ). On haplotype analysis, a higher rate of joint dysfunction was associated with *CYP19A1* haplotype A\_2\_3 ( $p=0.012$ ). **Conclusions:** The present study identified that *CYP19A1* and *HSD17B1* gene variants are associated with musculoskeletal adverse events and vasomotor symptoms in women with breast cancer treated with AIs. Specifically, patients with variant genotypes of the SNPs rs60271534, rs2830, and rs10046 reported a higher rate of MSAEs, whereas the rs7176005 polymorphism was associated with VMSs. Although further studies are required for confirmation, genotype analysis of these patients may identify those at increased risk of AEs, thus enabling a more personalized approach to breast cancer therapy.

**Key Words:** Aromatase inhibitors, breast cancer, *CYP19A1*, *ESR1*, *TCL1A*, *HSD17B1*, pharmacogenetics, adverse effects.

## 1. INTRODUCTION

Adjuvant hormonal therapy is the standard of care for hormone receptor-positive (HR+) breast cancer. Tamoxifen has been used for this purpose for several decades (Rao & Cobleigh, 2012). The benefits of adjuvant tamoxifen were demonstrated in the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) meta-analysis (EBCTCG et al, 2011) and confirmed by subsequent meta-analyses (Al-Mubarak et al, 2014). Recently, aromatase inhibitors (AIs) became the first-line drug of choice for treatment of postmenopausal women (Burstein et al, 2010), and third-generation AIs (such as letrozole, anastrozole, and exemestane) have shown superior efficacy as compared with tamoxifen (Lønning & Eikesdal, 2013). The benefits of AIs appear to be a class effect, with no clinical superiority of any one agent over the others (Dowsett et al, 2010).

However, despite several studies that have proved the efficacy of adjuvant hormonal therapy for receptor-positive breast cancer, with significant reductions in recurrence and mortality rates, adherence to AI therapy has always constituted a challenge, with treatment dropout rates ranging from 5% (Baum et al, 2002; Goss et al, 2003) to 20% (Partridge et al, 2008); it is estimated that musculoskeletal adverse events (MSAEs) and arthralgia account for 50% of cases of treatment discontinuation (Dent et al. 2007). Other adverse effects (AEs), such as loss of bone mass/osteoporosis (Eastell et al, 2008), cardiovascular events (Lønning & Eikesdal, 2013), and vasomotor symptoms (VMSs) (Mortimer, 2010), are also common with AI therapy, and also interfere with treatment adherence (Dent et al, 2006). In a long-term follow-up study, nonadherence rates were found to be even higher among women under the age of 60 (Schmidt et al, 2014).

Some investigations have shown that genetic polymorphisms, particularly in the *CYP19A1* (aromatase) gene, are significantly associated with different levels of circulating estrogens (Haiman et al, 2007; Dunning et al, 2004). More recently, studies have suggested that specific polymorphisms may be clinical predictors of the efficacy of AI therapy in patients with breast cancer (Abubakar et al, 2014). Therefore, polymorphisms in the *CYP19A1* gene and in other genes involved in the estrogen metabolism pathway may be associated with occurrence of different



adverse events in patients with breast cancer treated with AIs. Thus far, few studies have addressed the potential relationships between such polymorphisms and AEs. *CYP19A1* gene variants have been associated with increased bone loss (Napoli et al, 2013) and arthralgia (MSAEs) (Mao et al, 2011) and VMSs (Fontein et al, 2014), whereas *ESR1* and *TCL1A* polymorphisms have been associated with joint pain (Henry et al, 2013; Ingle et al, 2010).

The present study sought to conduct a genetic analysis of 16 SNPs (10 *CYP19A1*, two *ESR1*, two *TCL1A*, and two *HSD17B1* polymorphisms) in a series of women with HR+ breast cancer treated with third-generation AIs and describe any associations of these polymorphisms with adverse effects of AI therapy.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **Study design and patient population**

The sample comprised 204 women diagnosed with estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PR)-positive breast cancer between 1980 and 2013 at three public, university-affiliated hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital Conceição (GHC), and Hospital Femina (HFE). All patients received hormone therapy with third-generation AIs (anastrozole, letrozole, or exemestane) through the Brazilian Unified Health System. Patients provided their written informed consent to participate in this study. The Ethics Committees of the three institutions (HCPA, GHC, and HFE) approved the study protocol. The inclusion criteria were: (1) to have received a third-generation AI (anastrozole, letrozole, or exemestane) for at least 4 weeks as first-line hormonal therapy or as second-line therapy after tamoxifen; and (2) age  $\geq 18$  years.

### **DNA extraction**

DNA was obtained from saliva specimens collected at the time of study enrollment using the Oragene DNA Sample Collection Kit (OG-250, Disc Format, DNA Self-Collection Kit, Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). Extraction was performed in a 2.0-mL volume of Oragene-DNA/saliva mixed samples in

accordance with manufacturer protocol. Collection of saliva samples with the Oragene kit ensured high DNA yields and provided DNA of adequate quality for genetic testing in 100% of collected samples, as described elsewhere in the literature (Nunes et al, 2012).

### **Outcome measures**

Clinical data were collected with a standardized form developed for the study, both retrospectively (from the date of treatment onset until the date of study enrollment) and prospectively for 12 months after enrollment (DNA collection), by means of a chart review and by direct administration of a questionnaire to the included patients. The primary outcomes of interest were the occurrence of specific adverse effects (VMSs, arthralgia, myalgia, bone pain, joint dysfunction, osteoporosis) and a composite outcome of other AEs (loss of appetite, somnolence, nausea, dizziness, fatigue, dry mouth, constipation, sleep disorders, mood swings/depression, headache, weakness, among others) previously correlated or reported in association with AI therapy. Due to great similarity and frequent overlap between musculoskeletal symptoms, these adverse events were pooled into a single group (MSAEs) for purposes of analysis.

Several covariates were assessed. Demographic variables (age, race/ethnicity, educational attainment, age at last menstrual period) were self-reported by patients. Clinical variables, such as disease stage, prior chemotherapy, AI therapy, and time since onset of AI therapy were obtained via a questionnaire administered to patients and confirmed by a review of hospital records for quality control purposes.

### **Polymorphism selection and genotyping**

Genomic DNA was isolated from saliva as previously described and SNPs were selected to search for common genetic variants of the *CYP19A1*, *ESR1*, *HSD17B* and *TCLA1* genes on the basis of linkage disequilibrium information available through the International HapMap Project (National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.hapmap.org>), using the Haploview algorithm. We selected SNPs with a minor allele frequency (MAF)  $\geq 5\%$  in the

HapMap group of Utah residents of northern and western European ancestry (CEU), as previous studies have shown that this ethnic group exhibits the greatest genetic similarity to our study population (Pena et al, 2011), and/or SNPs with a functional impact on aromatase gene expression or aromatase activity and/or associated with adverse effects of AI therapy in breast cancer, as previously described in the literature. On the basis of these criteria, we included 10 *CYP19A1* SNPs (rs700518, rs4775936, rs60271534, rs4646, rs10459592, rs6493497, rs7176005, rs10046, rs700519, rs56658716), two *ESR1* SNPs (rs9322336, rs9340835), two *HSD17B1* SNPs (rs2830, rs605059), and two *TCL1A* SNPs (rs11849538, rs2369049).

Laboratory staff were blinded to all clinical data and other outcomes. Genotyping for the *CYP19A1* (TTTA)<sub>n</sub> tetranucleotide repeat polymorphism in intron 4 (rs60271534) was accomplished by means of PCR amplification as reported by Woods et al (2006), using site-specific primers with modifications to PCR conditions, followed by direct sequencing. For all other SNPs, genotyping was carried out by allele discrimination specific TaqMan SNP Genotyping Assays in accordance with manufacturer instructions. All assays were performed in 96-well plates including non-template controls. PCR runs were read in a 7500 Fast Real Time PCR System in endpoint mode using Allelic Discrimination Sequence Detector software (Applied Biosystems).

### **Genotype validation**

One SNP (rs56658716) was excluded because of assay failure. In case of assay failure, the affected sample was retested at least once in the same platform and was considered lost if the second attempt at genotyping also failed. In the event of genotyping failure of >50% of samples from the same patient, the patient would be excluded from the sample. The mean success rate of the other assays and of individual samples was >95%.

### **Statistical analysis**

All sample groups were tested for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), and between-group differences in allele and genotype frequencies were compared by

means of Chi-square or Fisher's exact test. A two-tailed p-value of  $<0.05$  was deemed significant. Statistical analyses were carried out in SPSS 18.0 (SPSS, www.spss.com, IBM, USA). Linkage disequilibrium (LD) of SNPs was calculated in Haploview 4.2 (Barrett et al, 2005), and haplotypes were inferred using the Bayesian algorithm implemented in Phase 2.1.1 (Stephens et al, 2001; Stephens & Donnelly, 2003). Due to the exploratory nature of these analyses, which include multiple hypothesis testing and will later require more in-depth investigation, we did not correct for multiple tests (Goeman & Solari, 2011).

### **3. RESULTS**

Analysis of genetic data and clinical outcomes was possible in 190 patients, out of 204 collected samples (Figure 1). The final sample comprised 190 women with a mean age of 68.3 years (SD=10.3 years). All were from Rio Grande do Sul, the southernmost state in Brazil (n=190). The mean age at diagnosis was 58.6 years (SD=11.1 years), and the mean age at onset of menopause was 47.1 years (SD=7.2 years). There were no significant differences between the excluded patients (n=14) and those included in the study (n=190) regarding tumor type, tumor grade, or treatment characteristics. Additional details on the demographic characteristics of the included patients are described in Table 1. The mean duration of AI treatment in the sample was 35.7 months (SD=18.2 months). Prospective 12-month follow-up was completed in the entire sample (10 patients died during the follow-up period). There were no significant differences in duration of therapy among the three AIs ( $p<0.05$ ). The allele frequencies of all 16 SNPs included and successfully genotyped were in HWE.

#### **Identification of SNPs associated with adverse effects of aromatase inhibitor therapy**

Approximately 48.9% of patients in the sample (93/190) reported the presence of VMSs (hot flashes/flushes) during AI therapy. As shown in Table 2, one SNP (rs7176005) was found to be associated with VMSs. This analysis found a statistically significant association between the homozygous TT genotype of

rs7176005 and reported rates of VMSs, which were higher in these patients than in those with at least one C allele ( $p=0.038$ ).

Presence of the GG genotype of rs10046 (*CYP19A1*) and of the GG genotype of rs2830 (*HSD17B1*) was associated with lower rates of joint dysfunction ( $p=0.002$ ) and osteoporosis ( $p=0.042$ ) respectively, on comparison with other genotypes carrying at least one A allele (Table 2). When analyzed as a pooled event (MSAEs), the occurrence of musculoskeletal adverse effects was associated with the *CYP19A1* short tandem repeat rs60271534. Specifically, carriers of the 6- and 10-repeat genotypes reported a higher rate of these symptoms than did carriers of other genotypes ( $p=0.001$ ). No associations were found with the other evaluated SNPs.

#### **Identification of haplotypes associated with adverse effects of aromatase inhibitor therapy**

Haplotype analysis identified the presence of four haplotypes for *ESR1* gene variants, four haplotypes for *HSD17B1* variants, and four haplotypes for *TCL1A* SNPs. The 10 SNPs of gene *CYP19A1* yielded 33 different haplotypes, of which four accounted for > 75% of the sample. Therefore, the remaining 29 rare haplotypes were pooled into a fifth group for purposes of analysis. Analysis of linkage disequilibrium showed that some were in statistically significant LD (LOD score  $\geq 2$ ) in gene *CYP19A1* (Figure 2, Table 3). Regarding LD analysis of the other genes (*ERS1*, *TCL1A*, and *HSD17B1*), all were in LD, and significantly so (LOD score = 8.06, 22.85, and 34.79 respectively).

Of the various outcomes of interest, only joint dysfunction was significantly associated with *CYP19A1* haplotype A\_2\_3. Presence of this haplotype was strongly associated with articular symptoms ( $p=0.012$ ). Interestingly, this haplotype phase (A\_2\_3) is composed of haplotypes 2 and 3 (Table 4), both of which are composed of rs10046, which, in turn, has been previously reported as associated with increased frequency of joint dysfunction in women with the GG genotype.

#### 4. DISCUSSION

The present study assessed the relationship between variants in the *CYP19A1*, *ESR1*, *TCL1A*, and *HSD17B1* genes, all of which are involved in the metabolic pathway targeted by AIs, and occurrence of adverse events during AI therapy in women with breast cancer. Of 190 women included in the analysis, nearly 90% were of European descent. This degree of genetic homogeneity has been reported in previous studies of populations from Southern Brazil (Santos et al, 2010). Our results suggest that the SNPs rs10046, rs7176005, rs60271534 (all in gene *CYP19A1*) and rs2830 (in gene *HSD17B1*) are associated with variation in the spectrum of adverse reactions to AI.

MSAEs and VMSs associated with hormonal therapy can influence treatment adherence and have a significant impact on patient quality of life. Previous studies have reported correlations between these AEs and circulating estrogen levels. Although we did not measure plasma hormone levels in our sample, this association is well established (Burstein, 2007; Fontein et al, 2013). The metabolic pathway targeted by AIs centers on the aromatase enzyme encoded by *CYP19A1*, a gene with multiple SNPs, which, in combination with variants of other genes involved in the estrogen synthesis process, may account for both clinical response to AIs and for their toxicity.

In a previous study, Henry et al. (2013) analyzed 138 variants of 24 genes (including 23 *CYP19A1* SNPs) and found a non-significant increase in the rate of MSAEs when at least eight repeats were present in rs60271534 (HR=1.8; 95%CI=0.8-1.8, p=0.49). This result is consistent with our findings, in which the 6/10-repeat genotype (carrying at least one allele with more than eight repeats) was directly associated with a higher rate of MSAEs. However, analysis of this variant performed by Mao et al. (2011) identified an increased risk of MSAEs in the presence of at least seven TTTA repeats (p=0.03), whereas patients with eight or more repeats had a lower risk of AI-induced arthralgia (p=0.03). These divergent results may be attributable to the potential importance of ethnic differences between patient populations, as the genetic variability of *CYP19A1* and the genetic variability of AI response are known to be affected by ethnicity (Moy et al., 2006).

Finally, in the Mao et al. (2011) sample, rs10046 was positively associated with MSAEs, but the association was not statistically significant ( $p=0.20$ ); in our study, this SNP was significantly associated with joint dysfunction ( $p=0.022$ ). Still on the subject of MSAEs, Liu et al. (2013) found no differences in the rate of these symptoms among patients stratified by SNPs rs4646 and rs2830; this is consistent with our findings. Park et al. (2011) found no associations between isolated SNPs and adverse effects. However, on haplotype analysis, the M\_3\_5 haplotype (which included rs12148604, rs4646, rs10046, rs700519, rs4324076, rs700518, rs3759811, rs727479, rs4775936, rs10459592, rs767199, rs10519297, rs1062033, rs2008691, rs1008805, and rs17523527) was associated with increased risk of MSAEs (bone pain and arthralgia) (OR=11.25; 95%CI=1.17–108.28,  $p=0.01$ ). The results of these investigators are consistent with our own findings, as both rs10046 and the A\_2\_3 haplotype (composed of rs4646, rs10046, rs700519, rs700518, rs4775936, rs10459592, rs6493497, and rs7176005) were associated with joint dysfunction in our sample. This suggests that SNPs with a small individual functional effect may have a cumulative influence on phenotype. Such a cumulative effect of haplotypes composed of SNPs with weak or absent individual associations has been reported elsewhere in the literature (Enjuanes et al, 2005).

Regarding VMSs, Fontein et al. (2014) studied 737 patients who were receiving adjuvant exemestane and found that TT homozygous status for the rs7176005 SNP was associated with increased risk of VMSs (univariate OR=1.758,  $p=0.025$ ), a result corroborated by our sample. The rs7176005 SNP, located in the 5'-flanking region of exon I.1 of *CYP19A1*, affects transcriptional activity of this gene in tumor tissue and, consequently, aromatase activity, and is thus associated with increased estrogen levels (Wang et al, 2010). This strongly suggests that, by modulating hormone levels, the rs7176005 variant may have effects on the symptoms associated with these changes.

In short, the present study found that variants in the genes *CYP19A1* (rs7176005, rs10046 e rs60271534) and *SD17B1* (rs2830) are associated with musculoskeletal and vasomotor adverse effects in Brazilian women with breast cancer treated with aromatase inhibitors. Furthermore, haplotype analysis

identified a *CYP19A1* haplotype (A\_2\_3) that was significantly correlated with increased rates of joint dysfunction in this patient population. Additional studies on the analyzed SNPs will be necessary to validate these outcomes in a clinical setting, with a view to improving aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to the Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).



## REFERENCES

1. Abubakar MB, Wei K, Gan SH. The influence of genetic polymorphisms on the efficacy and side effects of anastrozole in postmenopausal breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Dec;24(12):575-81.
2. Al-Mubarak M, Tibau A, Templeton AJ, Cescon DW, Ocana A, Seruga B, Amir E. Extended adjuvant tamoxifen for early breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2014, 9 (2):e88238.
3. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, et al: Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: First results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 359:2131-2139, 2002 (Erratum: *Lancet* 360:1520, 2002).
4. Burstein HJ (2007) Aromatase inhibitor-associated arthralgia syndrome. *Breast* 16(3):223–234.
5. Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3784-96.
6. Dent S, DeValentin T, Vandermeer L et al. Long term toxicities in women with early stage breast cancer treated with aromatase inhibitors: data from a tertiary care center. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100: S190.
7. Dent S, Hopkins S, Di Valentin T, Verreault J, Vandermeer L, Verma S. Adjuvant aromatase inhibitors in early breast cancer – toxicity and adherence. Important observations in clinical practice. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2007, 106 (S1): S111.
8. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, Buyse M, Baum M, Buzdar A, Colleoni M. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28: 509–518.
9. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96:936–945.
10. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer

hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011, 378(9793):771-84.

11. Eastell R, Adams JE, Coleman RE, Howell A, Hannon RA, Cuzick J, Mackey JR, Beckmann MW, Clack G. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26 1051–1058.
12. Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervia A, Nogues X, Ruiz-Gaspa S, Bustamante M, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Diez- Perez A (2005) Functional analysis of the I.3, I.6, pII and I.4 promoters of CYP19 (aromatase) gene in human osteoblasts and their role in vitamin D and dexamethasone stimulation. *Eur J Endocrinol* 153(6):981–988.
13. Fontein DB, Houtsma D, Nortier JW, Baak-Pablo RF, Kranenbarg EM, van der Straaten TR, Putter H, Seynaeve C, Gelderblom H, van de Velde CJ, Guchelaar HJ: Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014, 144:599-606.
14. Fontein DB, Seynaeve C, Hadji P, Hille ET, van de Water W, Putter H et al (2013) Specific adverse events predict survival benefit in patients treated with tamoxifen or aromatase inhibitors: an international tamoxifen exemestane adjuvant multinational trial analysis. *J Clin Oncol* 31(18):2257–2264.
15. Goeman J, Solari A. Multiple Testing for exploratory Research. *Stat Sci* 2011, 26(4):584–597.
16. Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al: A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 349:1793-1802, 2003.
17. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res* 2007, 67:1893–1897.
18. Henry NL, Skaar TC, Dantzer J, Li L, Kidwell K, Gersch C, Nguyen AT, Rae JM, Desta Z, Oesterreich S, Philips S, Carpenter JS, Storniolo AM, Stearns V, Hayes DF, Flockhart DA. Genetic associations with toxicity-related discontinuation of aromatase inhibitor therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Apr;138(3):807-16.
19. Ingle JN, Schaid DJ, Goss PE, Liu M, Mushiroda T, Chapman JA, Kubo M, Jenkins GD, Batzler A, Shepherd L et al. Genome-wide associations and functional genomic studies of musculoskeletal adverse events in women

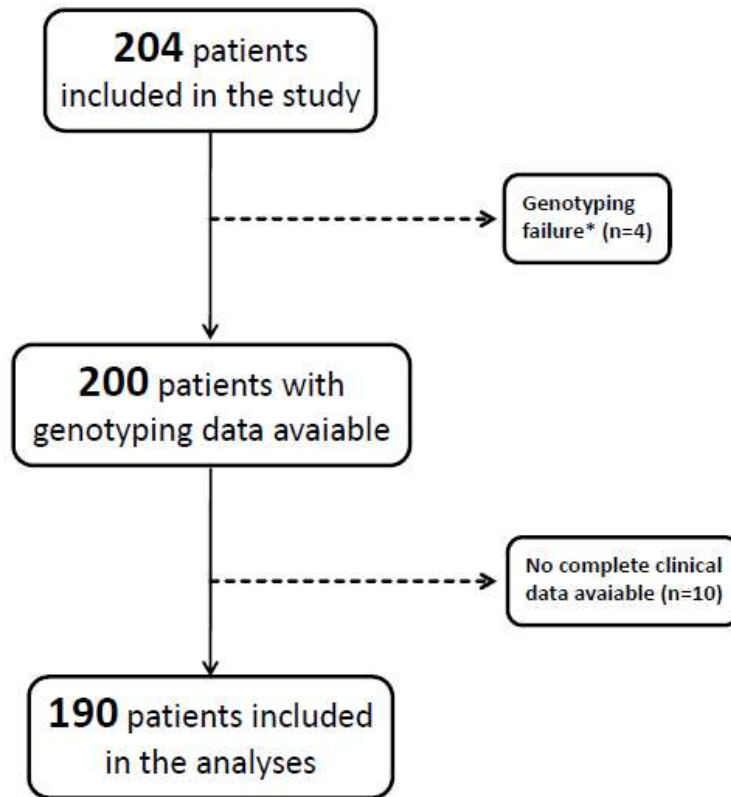
- receiving aromatase inhibitors. *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28 4674–4682.
20. Liu L, Bai YX, Zhou JH, Sun XW, Sui H, Zhang WJ, Yuan HH, Xie R, Wei XL, Zhang TT, Huang P, Li YJ, Wang JX, Zhao S, Zhang QY. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor, anastrozole, in metastatic breast carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2013;14:18973-88.
  21. Lønning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jun 24;20(4):R183-201.
  22. Mao JJ, Su HI, Feng R, Donelson ML, Aplenc R, Rebbeck TR, Stanczyk F, DeMichele A. Association of functional polymorphisms in CYP19A1 with aromatase inhibitor associated arthralgia in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* 2011 Jan 20;13(1):R8.
  23. Mortimer JE. Managing the toxicities of the aromatase inhibitors. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010, 22(1):56–60.
  24. Moy B, Tu D, Pater JL, Ingle JN, Shepherd LE, Whelan TJ, Goss PE (2006) Clinical outcomes of ethnic minority women in MA.17: a trial of letrozole after 5 years of tamoxifen in postmenopausal women with early stage breast cancer. *Ann Oncol* 17(11):1637–1643.
  25. Napoli N, Rastelli A, Ma C, Yarramaneni J, Vattikutti S, Moskowitz G, Giri T, Mueller C, Kulkarny V, Qualls C, Ellis M, Armamento-Villareal R. Genetic polymorphism at Val80 (rs700518) of the CYP19A1 gene is associated with aromatase inhibitor associated bone loss in women with ER + breast cancer. *Bone.* 2013 Aug;55(2):309-14.
  26. Nunes AP, Oliveira IO, Santos BR, Millech C, Silva LP, González DA, Hallal PC, Menezes AM, Araújo CL, Barros FC. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene™ DNA self-collection kit. *BMC Med Res Methodol* 2012, 4;12:65.
  27. Partridge AH, LaFountain A, Mayer E, Taylor BS, Winer E, Asnis-Alibozek A. Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26:556–562.
  28. Rao RD, Cobleigh MA. Adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2012, 26(6):541-7.
  29. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE (2010) Assessing individual interethnic admixture and population

substructure using a 48 insertion/ deletion ancestry-informative marker panel. *Hum Mutat* 31:184–190.

30. Schmidt N, Kostev K, Jockwig A, Kyvernitakis I, Albert US, Hadji P. Treatment persistence evaluation of tamoxifen and aromatase inhibitors in breast cancer patients in early and late stage disease. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2014 Nov;52(11):933-9.
31. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet USA* 2003, 1162–1169.
32. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001, 20 (1): 978–989.

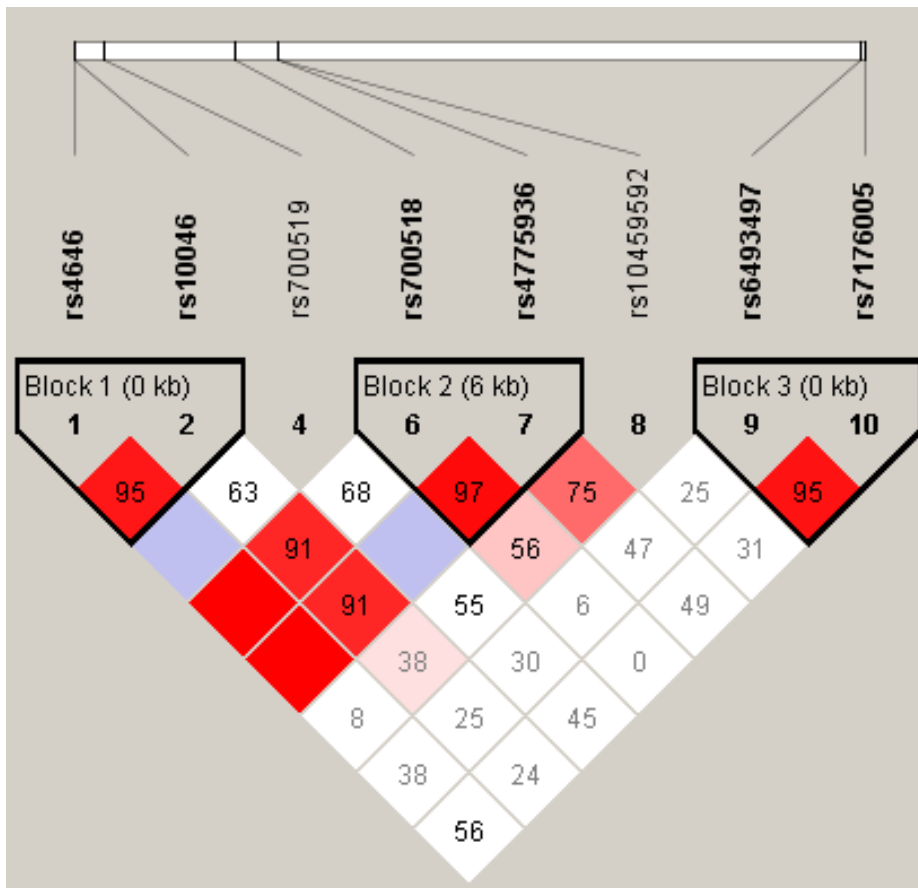
## FIGURES

**Figure 1.** Flow diagram of patients included in the current study.



\* Samples were repeated once on the same platform and were considered genotyping failures if a re-run generated poor results for more than 50% of the SNPs for a second time .

**Figure 2.** Linkage disequilibrium plot for SNPs in the *CYP19A1* gene.



The value within each diamond is  $D'$  between pairs of SNPs, estimated based on control subjects. The red-to-white gradient reflects higher to lower linkage disequilibrium values (red, high; white, low).

**Table 1.** Baseline characteristics of patients included in the analyses.

<b>Baseline characteristics</b>	<b>n</b>	<b>percent</b>
<b>Age (years)</b>		
≤59	63	33,2
60-69	65	34,2
≥70	62	32,6
<b>Menopausal status</b>		
Premenopausal	25	13,2
Postmenopausal	141	74,2
Unknown	24	12,6
<b>Self-reported color</b>		
White	168	88,4
Black	11	5,8
Brown	3	1,6
Not reported	8	4,2
<b>ER status</b>		
Positive	182	95,8
Negative	6	3,2
Unknown	2	1,1
<b>PR status</b>		
Positive	156	82,1
Negative	29	15,3
Unknown	5	2,6
<b>HER2 status</b>		
Positive	34	17,9
Negative	124	65,3
Unknown	32	16,8
<b>Tumor grade</b>		
I	20	10,5
II	79	41,6
III	37	19,5
Unknown	54	28,4
<b>Histological type</b>		
Invasive ductal carcinoma	148	77,9
Invasive lobular carcinoma	24	12,6
Others	5	2,6
Unknown	13	6,8
<b>Distant metastasis</b>		
Yes	17	8,9
No	115	60,5
Not reported	58	30,5
<b>Aromatase inhibitors</b>		
Anastrozole	133	70,0
Letrozole	41	21,6
Exemestane	16	8,4
<b>Adjuvant radiotherapy</b>		
Yes	135	71,1

	49	25,8
No		
Not reported	6	3,2
<b>Adjuvant chemotherapy</b>		
Yes	92	48,4
No	86	45,3
Not reported	12	6,3
<b>Most extensive surgery</b>		
Mastectomy	75	39,5
Wide local excision	113	59,5
No resection	2	1,1
<b>Adverse events (AEs)</b>		
<b>Musculoskeletal AEs</b>		
Yes	134	70,5
No	56	29,5
<b>Vasomotor symptoms</b>		
Yes	93	48,9
No	97	51,1
<b>Others</b>		
Yes	138	72,6
No	52	27,4



**Table 2.** Association between side effects of aromatase inhibitors treatment and SNPs.

<b>SNP (Gene)</b>	<b>Vasomotor symptoms</b>			
<b>rs7176005 (CYP19A1)</b>	<b>TT (%)</b>	<b>CT (%)</b>	<b>CC (%)</b>	<b>p-value*</b>
Yes	5 (2,7)	20 (10,6)	67 (35,6)	0,038
No	0 (0)	28 (14,9)	68 (36,2)	
	<b>Musculoskeletal adverse events</b>			
<b>rs60271534 (CYP19A1)</b>	<b>6/10 repeats (%)</b>	<b>others (%)</b>		<b>p-value*</b>
Yes	60 (34,9)	63 (36,6)		0,001
No	15 (8,7)	34 (19,8)		
	<b>Articular dysfunction</b>			
<b>rs10046 (CYP19A1)</b>	<b>GG (%)</b>	<b>AG (%)</b>	<b>AG (%)</b>	<b>p-value*</b>
Yes	6 (3,2)	18 (9,7)	16 (8,6)	0,022
No	29 (15,6)	89 (47,8)	28 (15,1)	
	<b>Osteoporosis</b>			
<b>rs2830 (HSD17B1)</b>	<b>GG (%)</b>	<b>AG (%)</b>	<b>AG (%)</b>	<b>p-value*</b>
Yes	7 (3,7)	19 (10,2)	1 (0,5)	0,042
No	43 (23,0)	80 (42,8)	37 (19,8)	

\* chi-squared p-value (Fisher exact test)

**Table 3.** Values of D' for analysis of linkage disequilibrium (LD) between the *CYP19A1* SNPs.

D'	rs4646	rs10046	rs700519	rs700518	rs4775936	rs10459592	rs6493497	rs7176005
<b>rs4646</b>	-							
<b>rs10046</b>	0.95*	-						
<b>rs700519</b>	1.00	0.635	-					
<b>rs700518</b>	1.00	0.914*	0.685	-				
<b>rs4775936</b>	1.00*	0.913*	1.00	0.976*	-			
<b>rs10459592</b>	0.083	0.389*	0.559	0.56*	0.759*	-		
<b>rs6493497</b>	0.384	0.251	0.307	0.067	0.471	0.257	-	
<b>rs7176005</b>	0.563	0.246	0.453	0.004	0.495	0.318	0.958*	-

\*LOD score >2

**Table 4.** Composition and frequency of *CYP19A1* polymorphisms in breast cancer women treated with aromatase inhibitors.

Haplotypes	Haplotype composition*	Haplotype frequency (%)
1	A G C T C G G C	29,21
2	A G C T C T G C	16,09
3	C G C T C T G C	14,6
4	A G C T C G G C	9,9
5	Others haplotypes**	26,49

\* SNPs composing *CYP19A1* haplotypes are disposed as follow: rs4646, rs10046, rs700519, rs700518, rs4775936, rs10459592, rs6493497, rs7176005.

\*\* All others 29 haplotypes included in this group have <3% frequency.

## Capítulo VII – Artigo 4

---

**Análise comparativa dos custos de inibidores da aromatase de terceira geração no tratamento do câncer de mama na perspectiva do Sistema Único de Saúde.**

Artigo em elaboração

**Análise comparativa dos custos de inibidores da aromatase de terceira geração no tratamento do câncer de mama na perspectiva do Sistema Único de Saúde.**

Oswaldo Artigalás<sup>1,2</sup> ([artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)), Fernanda Hendges de Bitencourt<sup>1</sup> ([nandahbitencourt@gmail.com](mailto:nandahbitencourt@gmail.com)), Tazio Vanni<sup>4</sup> ([taziovanni@gmail.com](mailto:taziovanni@gmail.com)), Patricia Ashton-Prolla<sup>1,3</sup> ([pprolla@gmail.com](mailto:pprolla@gmail.com)), Ida Vanessa Schwartz<sup>1,3</sup> ([idadschwartz@gmail.com](mailto:idadschwartz@gmail.com)).

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. <sup>2</sup> Unidade de Genética, Hospital da Criança, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brasil. <sup>3</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil. <sup>4</sup> Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil.

**Autor correspondente:** Oswaldo Artigalás. UFRGS - Campus do Vale - Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M CEP:91501-970 - Caixa Postal 15053 - Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: 55-51-33086722. Email: [artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer (não-cutâneo) mais comum entre as mulheres no Brasil, sendo que em mais de 70% dos casos esses tumores expressam receptores hormonais, fazendo com que a hormonioterapia adjuvante seja importante arma no controle da doença. Os inibidores da aromatase (IA) de terceira geração (anastrozol, letrozol e exemestano) estão cada vez mais ampliando sua indicação nesse contexto, demonstrando maior eficácia quando comparados ao tamoxifeno. No entanto, esse grupo de medicamentos tem valor mais elevados, aumentando assim os custos do tratamento dessas pacientes. Dentro desse cenário, o objetivo desse estudo foi realizar uma análise econômica dos custos relacionados ao uso dos três IA no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS). As estimativas de custo consideraram a observação de 190 pacientes em atendimento em três hospitais públicos terciários (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA; Hospital Nossa Senhora Conceição, HSNC; Hospital Femina, HFE) da cidade de Porto Alegre, referência no atendimento de câncer de mama na região. Os custos finais, somatório dos dois períodos (inicial e seguimento de 12 meses), diferiram de forma significativa entre os três inibidores da aromatase ( $p=0,014$ ). O custo final mensal para tratamento do câncer de mama com uso de anastrozol teve uma mediana de R\$188,03 (IQR=87,94-313,63), sendo significativamente inferior ao custo de tratamento com letrozol (mediana R\$244,44; IQR=151,42-432,95) ( $p=0,026$ ). Nas análises de custos entre hospitais, não houve diferença significativa quanto aos custos do período inicial entre as três instituições, no entanto, os custos no seguimento prospectivo de 12 meses foram significativamente inferiores no HCPA. Dessa forma, foi possível estimar um valor de referência quanto aos custos do tratamento de mulheres em uso de um dos principais IA, gerando uma série de informações que poderão ser utilizadas em avaliações de custo-efetividade, além de explorar um conjunto de elementos que podem impactar no custo desse tratamento.

**Palavras-chave:** Inibidores da aromatase, câncer de mama, análise de custos, sistema público de saúde, farmacoeconomia.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a principal causa de morte em mulheres por neoplasia, com um total estimado de mais de 1,5 milhões de diagnóstico e uma mortalidade superior a 500.000 óbitos em mulheres no ano de 2012 (GLOBOCAN, 2012). O câncer de mama tornou-se o mais prevalente hoje no mundo devido não somente à sua alta incidência, mas também ao seu bom prognóstico em estadios iniciais. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Dessa forma, sabemos que no ano de 2012 o Brasil teve 13.746 mortes por câncer de mama, e um total acumulado de 124.773 no período de 10 anos (2002-2012), sendo quase sua totalidade em mulheres (123.545), segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCAa), representando 20,8% do total de neoplasias em mulheres, com uma estimativa de 57.120 novos casos para o ano de 2014 (INCAb). No Rio Grande do Sul, a taxa bruta de incidência por 100.000 mulheres é de 87,72 casos, sendo o segundo estado do país em incidência, atrás apenas do Rio de Janeiro com 96,47 casos por 100.000 habitantes (INCAc).

Uma importante característica do câncer de mama é a expressão tumoral de receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona), que ocorre em aproximadamente 75% a 80% de pacientes, e que é usado para orientar o tratamento através da indicação ou não de terapia hormonal adjuvante (Bulun et al, 2005; Toniolo et al, 1995). O tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), tem sido há décadas a terapia padrão-ouro em pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo (RH+) (EBCTCG et al, 2011; Davies et al, 2012). No entanto, a terceira geração de inibidores da aromatase (IA) (como letrozol, anastrozol e exemestano) tem demonstrado ser mais eficaz do que o tamoxifeno (Lønning e Eikesdal, 2013), se tornando atualmente o tratamento endócrino adjuvante padrão para mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama RH+. Uma recente meta-análise não encontrou nenhuma diferença na eficácia anti-tumoral entre estes três principais IA, anteriormente citados (Dowsett et al, 2010). Atualmente, o uso de inibidores da aromatase em monoterapia ou em

tratamento seqüencial após o uso de tamoxifeno (esquema *switch*) em um total de 5 anos são consideradas opções de tratamento eqüipotentas (Smith & Dowsett, 2003; Geisler et al, 2002; Lønning & Eikesdal, 2013).

Avaliações econômicas de novos tratamentos vêm sendo demandadas, com vistas a orientar suas decisões relacionadas à incorporação do procedimento aos sistemas de saúde, seja ele público ou privado. Além disso, para a realização de estudos de custo-efetividade de base local e na perspectiva do Sistema Único de Saúde (SUS), estimativas dos custos reais das intervenções são essenciais (Caetano et al, 2014). No entanto, estudos de custos do uso de inibidores da aromatase baseados em dados coletados diretamente do sistema de saúde a respeito de pacientes já atendidas são escassos na literatura (praticamente inexitem em nosso meio), não havendo referências sobre estes. Os custos da tecnologia representam o valor de todos os recursos utilizados na sua produção e distribuição, como tempo, espaço físico, recursos humanos, bens de capital e materiais de consumo, assim como outros procedimentos utilizados em virtude do uso da tecnologia. Cabe ressaltar que estes valores variam de acordo com a perspectiva escolhida para análise, qual seja a do provedor do serviço, financiador da assistência, pacientes e famílias etc. (Drummond et al, 2005).

No presente estudo, o objetivo foi realizar uma análise econômica dos custos relacionados ao uso dos três inibidores da aromatase de terceira geração, no contexto do sistema de saúde público brasileiro (SUS), como forma de contribuir para futuras pesquisas sobre custo-efetividade desses fármacos embasados em dados reais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Método de custeio e locais do estudo**

As estimativas de custo para o tratamento de mulheres com câncer de mama em uso de inibidores da aromatase foram realizadas através de um inventário e mensuração detalhados de todos os recursos consumidos na provisão dessa intervenção de saúde, através do qual foi possível estabelecer um custo médio nos diferentes subgrupos da amostra. Foi adotada a perspectiva do



SUS como provedor de serviços, dessa forma, os custos foram estimados com base nos procedimentos realizados em três dos maiores hospitais públicos do estado Rio Grande do Sul que prestam atendimento a mulheres com câncer de mama: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) e Hospital Femina (HFE), estes dois últimos fazendo parte do mesmo complexo hospitalar (Grupo Hospitalar Conceição, GHC). A natureza pública das instituições, sua capacidade instalada e expertise de seus profissionais, bem como o volume de pacientes atendidos justificaram a escolha deste lócus.

### **Coleta de dados primários**

A coleta dos dados foi realizada através da revisão completa dos arquivos médicos e prontuários eletrônicos de 202 pacientes em atendimento, de forma retrospectiva. Quando dados eram incompletos as mesmas eram contatadas e as informações completadas. A coleta para as estimativas de custos foi realizada entre março e julho de 2014, incluindo informações desde os início do uso de inibidores pela respectiva paciente. Critérios de exclusão compreenderam casos não-oncológicos, pacientes que faziam parte de protocolos de pesquisa ou que não realizaram o uso de inibidores da aromatase por um período mínimo de quatro semanas. Para cada uma das pacientes incluídas no estudo, todos os dados referentes a internações, procedimentos terapêuticos (como cirurgias) e diagnósticos (como exames laboratoriais e de imagem), número de atendimentos ambulatoriais, e realização de tratamentos concomitantes (como quimioterapia, radioterapia e medicações correlacionados à doença de base) foram registrados em formulário específico.

### **Quantificação e valoração dos recursos**

Os valores dos diferentes insumos e procedimentos foram valorados de acordo com os dados obtidos junto ao portal do Governo Federal SIGTAP - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS (<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/inicio.jsp>). Custos operacionais (“*overhead*”), como luz, água e esgoto, assim como custos de telefonia e segurança, custos de lavanderia e descarte de lixo não foram incluídos nesse estudo.

### **Análises estatísticas**

Os dados coletados foram todos tabulados em planilha Excel® (Microsoft Corp., Estados Unidos) desenvolvida para registro dos custos com os diferentes inibidores da aromatase (anastrozol, letrozol e exemestano), outros insumos (descritos anteriormente) e os respectivos valores correspondentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 20 (SPSS, www.spss.com, IBM, EUA).

Os valores dos custos foram convertidos em função logarítmica para que análises estatísticas paramétricas (“ANOVA *two-way*”) pudessem ser realizadas, desta forma para re-conversão para valores monetários foi necessário o cálculo da média geométrica. Pacientes que não tiveram quaisquer registros de custos registrados no seguimento de 12 meses (ausência de consultas ou exames registrados) foram excluídos da análise. Devido ao reduzido tamanho amostral em alguns subgrupos de análise e assimetria dos valores de custos de seguimento, foi realizado teste não-paramétrico (teste de Kruskal-Wallis, “ANOVA *one-way*”), o que não permitiu que fosse realizada análise da interação Hospital/IA nesse período.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa de todas as instituições envolvidas.

### **3. RESULTADOS**

Foram coletados dados de 204 pacientes (50% provenientes do HCPA, 25,4% dos HNSC e 24,6% do HFE), das quais foi possível obter dados completos de forma retrospectiva e posteriormente aos 12 meses de seguimento em 190 pacientes, cuja média de idade foi 68,3 anos (SD=10,3 anos), todas provenientes do estado do Rio Grande do Sul. A média de idade ao diagnóstico foi de 58,6 anos (SD=11,1), com média de idade da menopausa aos 47,1 anos (SD=7,2). Todas as pacientes incluídas no estudo haviam realizado exame imunohistoquímico em tecido tumoral, com positividade para receptores de estrogênio e progesterona de 95,8% e 82,1%, respectivamente. O tipo histológico mais comum foi o carcinoma

ductal invasor (77,9%), seguido do lobular invasor (12,6%). O tempo médio de uso de inibidores da aromatase na nossa amostra foi de 35,7 meses (SD=18,2 meses), com um tempo mínimo de uso de 3,1 meses e máximo de 109,5 meses. A determinação de cor/raça foi feita por auto-declaração, sendo nossa amostra composta por 88,4% de mulheres brancas, 5,8% negras e 1,6% pardas (apenas 8 pacientes não realizaram a auto-declaração). Grande parte da nossa amostra fez uso de anastrozol (70,0% das pacientes), seguidas de letrozol (41%) e exemestano (16%). A maioria das pacientes incluídas no estudo realizaram radioterapia adjuvante (71,1%), sendo a quimioterapia adjuvante menos freqüente em nossa amostra (48,4%). A modalidade cirúrgica mais freqüente empregada em nossa amostra foi a excisão local (setorectomia com linfonodo sentinela ou esvaziamento axilar) em mais da metade das pacientes (59,5%), seguida pela mastectomia radical (39,5%). Não houve nenhuma diferença significativa entre as pacientes excluídas por falta de dados completos (n=14) e as incluídas no estudo (n=190), com relação ao tipo e grau tumoral, bem como a características do tratamento.

Os custos finais, somatório dos dois períodos (inicial e seguimento de 12 meses), diferiram de forma significativa entre os três inibidores da aromatase ( $p=0,014$ ). O custo final mensal para tratamento do câncer de mama com uso de anastrozol teve uma mediana de R\$188,03 (IQR=87,94-313,63), sendo significativamente inferior ao custo de tratamento com letrozol (mediana R\$244,44; IQR=151,42-432,95) ( $p=0,026$ ). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativas entre os custos do exemestano (mediana R\$271,03, IQR=201,69-363,59) em relação aos demais ( $p>0,05$ ), apesar da mediana superior, o que provavelmente se deve aos seu menor número amostral em nossa população (Gráfico 1).

#### **Análises comparativas entre os inibidores da aromatase**

Os custos de procedimentos diagnósticos envolvendo exames completos de imagem (radiografias, ressonâncias, mamografias, etc) e laboratoriais (hemogramas, provas de função hepática, etc), bem como decorrentes de biópsias, exames anatomopatológicos e IHQ, mostraram valor médio mensal de R\$16,29 para pacientes em uso de anastrozol no período compreendido entre o

diagnóstico e a entrada no estudo. Nas pacientes em uso de letrozol esse valor foi de R\$13,32, e de R\$122,62 nas pacientes tratadas com exemestano, evidenciando que esse último inibidor das aromatase teve valor significativamente superior no que tange custos de procedimentos diagnósticos ( $p < 0,001$ ). A mesma diferença de custos foi encontrada em relação aos procedimentos terapêuticos utilizados pelas pacientes em tratamento com anastrozol (R\$102,55/mês), letrozol (R\$57,10/mês) e exemestano (R\$462,81/mês), com esse último fármaco tendo valores superiores aos dois primeiros de forma estatisticamente significativa ( $p = 0,002$ ). Com relação aos custos de internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais dessas pacientes não houve diferença significativa ( $p = 0,098$ ). Dessa forma, quando computados os custos totais iniciais (por mês) nessas pacientes, verificamos que o grupo exemestano apresentou valores significativamente superiores ao anastrozol e letrozol ( $p < 0,001$ ), Tabela 1.

No entanto, quando aferidos os custos de forma prospectiva no mesmo período para os grupos de pacientes em uso de um dos 3 IA (de 1º de agosto de 2013 a 31 de julho de 2014), não encontramos diferenças quanto aos custos de procedimentos diagnósticos ( $p = 0,315$ ), apesar de haver diferença estatisticamente significativa com relação a custos de internações e atendimentos ambulatoriais, entre os três medicamentos ( $p = 0,011$ ), fazendo com que a mediana de custos de seguimento no período dos últimos 12 meses do estudo fosse de R\$176,40 para o grupo anastrozol, R\$318,24 para o grupo letrozol e R\$533,20 para o grupo exemestano ( $p = 0,042$ ), como mostrado na Tabela 1.

#### **Análises comparativas entre as unidades hospitalares**

Na análise de custos totais do período prévio a entrada no estudo não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as três unidades hospitalares ( $p = 0,207$ ). Mesmo após o detalhamento do custeio, os custos mensais de procedimentos diagnósticos em pacientes com câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase entre os três hospitais não diferiu de forma estatisticamente significativa ( $p = 0,301$ ), o mesmo ocorrendo com os valores médios de custos mensais com procedimentos terapêuticos: HCPA (R\$116,31, IC 95% = 61,44-220,20), HNSC (R\$69,01; IC 95% = 45,22-105,34) e HFE (R\$111,36, IC95% = 70,69-175,44) ( $p = 0,227$ ). Quanto aos gastos mensais médios com

consultas ambulatoriais e internações hospitalares também houve equiparação entre as três instituições ( $p=0,734$ ). Contudo, quando analisados de forma prospectiva nos últimos 12 meses do estudo, os custos difeririam de forma estatisticamente significativa entre os hospitais ( $p<0,001$ ), tendo o Hospital de Clínicas de Porto Alegre valores inferiores aos dos demais, tanto em relação aos custos com procedimentos diagnósticos, quanto os custos com internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais, fazendo com o que o custo total final do seguimento fosse também menor ( $p<0,001$ ), Tabela 2.

Em todos os parâmetros de custeio acima analisados (procedimentos diagnósticos e terapêuticos, internações e consultas ambulatoriais), realizamos análise estatística para averiguar se ocorria a interação entre o tipo de inibidor de aromatase em uso e a unidade hospitalar de tratamento das pacientes, mas em nenhum dos casos se verificou essa interação ( $p>0,05$ ).

#### **4. DISCUSSÃO**

A despeito de sua crescente aplicabilidade terapêutica, os inibidores ainda são medicações com custo superior ao tamoxifeno no tratamento do câncer de mama receptores hormonais positivos, reforçando a importância de estimativas de custo destes fármacos. Estudos de análises de custos no cenário brasileiro e, em especial, no Sistema Único de Saúde inexistem.

Dessa forma, apesar das limitações presentes em nosso estudo decorrentes dos registros incompletos nos prontuários médicos, da ampla intersecção entre o sistema de saúde público e privado que ocorre no Brasil (fazendo que muitas pacientes se utilizem do primeiro para acesso às medicações orais, não cobertas pelo segundo), bem como a ausência de padronização nos protocolos de atendimento assistencial dessas mulheres, essa análise da situação atual possibilitará simulações nas variações dos recursos, gerando cenários diversos que expandem a compreensão e utilidade dos dados obtidos.

Assim sendo podemos averiguar que os custos associados a uso de exemestano foram, de forma geral, mais elevados que a dos outros dois fármacos estudados, especialmente no período inicial de tratamento onde os valores gastos

com procedimentos diagnósticos e procedimentos terapêuticos associados (como quimioterapia e radioterapia adjuvante) foram superiores. Esse resultado não se sustentou de forma significativa no período de seguimento, indicando que as diferenças de custos parecem estar mais acentuadas no período em que a paciente ingressa no regime hormonioterápico. Levando-se em consideração que os ensaios clínicos mais recentes indicam uma similaridade de eficácia entre os diferentes IA (Dowsett et al, 2010), estimativas de custos entre fármacos com o chamado “efeito de classe” tornam-se ferramentas ainda mais úteis no gerenciamento de recursos em saúde, já que estes notadamente são escassos.

A inexistência de informações sobre os custos reais do tratamento de mulheres submetidas ao uso de inibidores da aromatase no país dificulta a realização de análises de custo-efetividade desses fármacos, muitas vezes com estudos baseados em modelagens computacionais que se utilizam de dados publicados na literatura internacional e que podem ser questionados quanto a validade no contexto brasileiro (Sasse & Sasse, 2009; Fonseca et al, 2009).

Quando a análise de custos se deu em relação aos diferentes hospitais participantes do estudo, encontramos que os valores totais gastos por paciente não foram significativamente diferentes entre as instituições no período inicial de tratamento. Contudo, quando analisado o seguimento prospectivo no período de 12 meses finais do estudo, valores menores foram encontrados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em relação aos demais. Essa diferença pode ser secundária a protocolos de seguimento distintos, já que não é esperado maior gravidade das pacientes entre os hospitais, já que todos são de nível terciário e referências estaduais no tratamento do câncer de mama (INCA, 2009).

Dessa forma, nosso trabalho permitiu estimar um valor de referência para os três principais inibidores da aromatase utilizados atualmente no tratamento hormonioterápico do câncer de mama, gerando uma série de informações que poderão ser utilizadas em avaliações de custo-efetividade, além de explorar um conjunto de elementos que podem impactar no custo desse tratamento nas instituições públicas de saúde do Brasil, na perspectiva do Sistema Único de Saúde. No entanto, novos estudos são necessários com vistas a esclarecer algumas lacunas nesse tema, decorrentes das limitações já apontadas.

## **CONFLITOS DE INTERESSES**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS), ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## REFERÊNCIAS

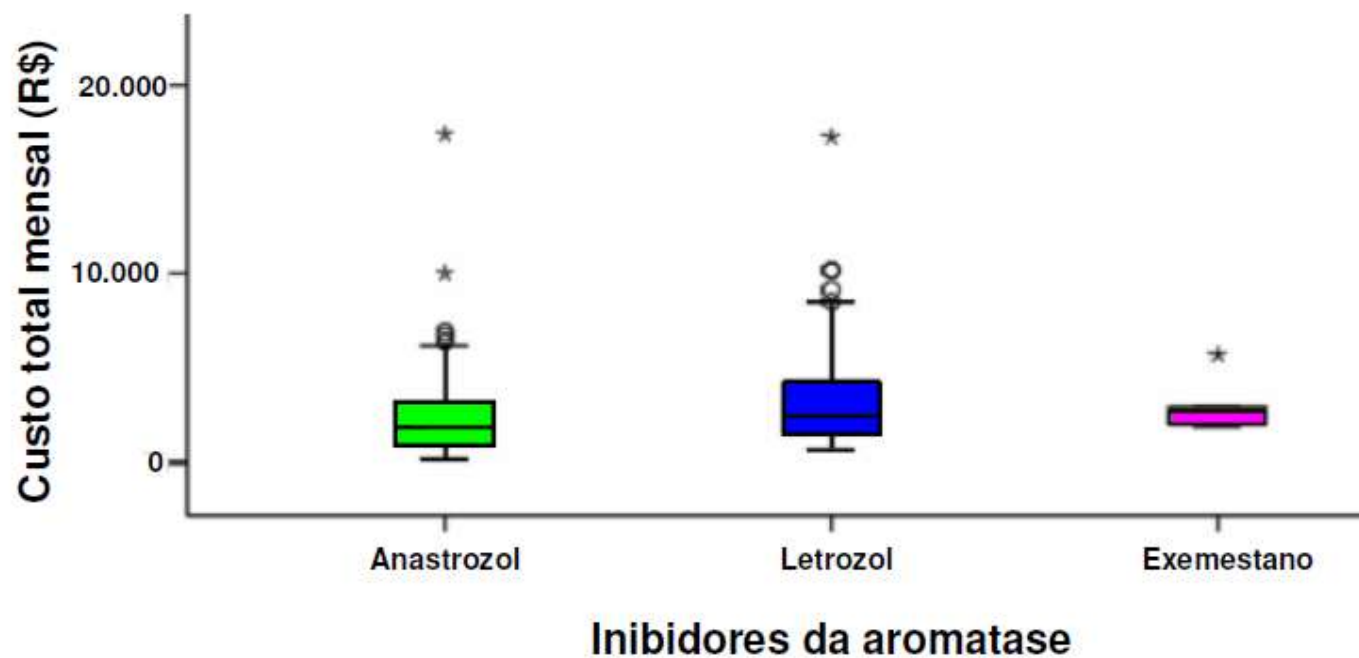
1. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, et al: Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005, 57(3):359-383.
2. Caetano R, Schluckebier LF, Bastos CR, Silva RM, Carneiro MP, Silva JW, Biz AN. Cost analysis of 18F-FDG PET-CT from the perspective of the Brazilian Unified National Health System as healthcare provider: a study in a public healthcare center in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2014 Feb;30(2):379-92.
3. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R et al. (2012) Longterm effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet Publishing House*.
4. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, Buyse M, Baum M, Buzdar A, Colleoni M. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28: 509–518.
5. Drummond M, Sculpher MJ, Torrance GW, O'Brien B, Stoddart GL. *Methods for the economic evaluation of health care programmes*. 3rd Ed. Oxford: Oxford University Press; 2005.
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M et al. (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378(9793):771-84.
7. Fonseca M, Araújo GT, Saad ED. Cost-effectiveness of anastrozole, in comparison with tamoxifen, in the adjuvant treatment of early breast cancer in Brazil. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(4):410-5.
8. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE: Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 2002, 20(3):751-757.
9. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012; 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> [Accessed 2 December 2014]
10. INCAa. Instituto Nacional de Câncer. 2014. Estatísticas do Câncer: Vigilância e Fatores de Risco. Available on <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.



11. INCAb. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Manual de rotinas e procedimentos para registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
12. INCAc. Instituto Nacional de Câncer. 2014. Registro Hospitalar de câncer. [https://irhc.inca.gov.br/files/Notas\\_tecnicas\\_final.pdf](https://irhc.inca.gov.br/files/Notas_tecnicas_final.pdf).
13. INCAAd. Instituto Nacional de Câncer. 2009. Hospitais com Registros Hospitalares de Câncer Região Sul. [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/RHC/RHC\\_regiao\\_sul.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/RHC/RHC_regiao_sul.pdf)
14. Lønning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Jun 24;20(4):R183-201.
15. Sasse AD, Sasse EC. Cost-effectiveness analysis of adjuvant anastrozol in post-menopausal women with breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2009 Sep-Oct;55(5):535-40.
16. Smith IE, Dowsett M: Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003, 348(24):2431-2442.
17. Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS: A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(3):190-197.

## FIGURAS

**Gráfico 1.** Análise de custo total mensal (em reais) de pacientes com câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase de terceira geração no Sistema Único de Saúde\*.



\*Análise por teste não-paramétrico para amostras independentes (Kruskal-Wallis).

**Tabela 1.** Custos mensais em reais (R\$) por paciente entre os diferentes inibidores da aromatase.

Custos médios por paciente	Inicial*			p
	A (IC 95%)	L (IC 95%)	E (IC 95%)	
Custos com procedimentos diagnósticos <sup>(1)</sup>	16,29 (12,82-20,71)	13,32 (7,44-23,82)	122,62 (63,69-236,08)	<0,001
Custos com procedimentos terapêuticos <sup>(2)</sup>	102,55 (77,04-136,51)	57,10 (29,51-110,48)	462,81 (220,17-972,82)	0,002
Custos com internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais	21,85 (16,65-28,67)	17,09 (8,98-32,52)	51,52 (24,96-106,32)	0,098
<b>Custos totais</b>	<b>270,79 (234,83-312,26)</b>	<b>215,87 (152,76-305,06)</b>	<b>765,53 (518,48-1130,30)</b>	<b>&lt;0,001</b>
Custos médios por paciente	Seguimento 12 meses**			p
	A (IQR)	L (IQR)	E (IQR)	
Custos com procedimentos diagnósticos <sup>(1)</sup>	190,99 (32,50-584,26)	278,24 (127,11-564,82)	151,53 (38,08-624,12)	0,315
Custos com procedimentos terapêuticos <sup>(2)</sup>	NC	NC	NC	
Custos com internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais	50,00 (30,00-190,00)	90,00 (50,00-315,00)	215,00 (115,00-571,80)	0,011
<b>Custos totais</b>	<b>176,40 (36,25-539,74)</b>	<b>318,24 (80,00-713,95)</b>	<b>533,20 (162,92-923,52)</b>	<b>0,042</b>

A= anastrozol; L=letrozol; E=exemestano; IC 95%= intervalo de confiança de 95%; IQR= intervalo interquartil; NC= não computado

\* média geométrica

\*\* mediana

<sup>(1)</sup> exames complementares, biópsias, exames de imagem

<sup>(2)</sup> Quimioterapia, radioterapia, cirurgias. Excluindo o valor da hormonioterapia com IA.

**Tabela 2.** Custos mensais em reais (R\$) por paciente entre os diferentes hospitais.

Custos médios por paciente	Inicial*			p
	Hospital A (IC 95%)	Hospital B (IC 95%)	Hospital C (IC 95%)	
Custos com procedimentos diagnósticos <sup>(1)</sup>	25,59 (14,57-44,92)	13,24 (9,31-18,82)	20,65 (13,83-30,83)	0,301
Custos com procedimentos terapêuticos <sup>(2)</sup>	116,31 (61,44-220,20)	69,01 (45,22-105,34)	111,36 (70,69-175,44)	0,227
Custos com internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais	23,52 (12,62-43,83)	19,80 (13,26-29,57)	22,93 (14,72-35,72)	0,734
<b>Custos totais</b>	<b>322,8 (230,45-450,15)</b>	<b>229,03 (185,80-282,31)</b>	<b>295,39 (232,73-374,91)</b>	<b>0,207</b>
Custos médios por paciente	Seguimento 12 meses**			p
	Hospital A (IQR)	Hospital B (IQR)	Hospital C (IQR)	
Custos com procedimentos diagnósticos <sup>(1)</sup>	32,50 (16,25-270,80)	281,62 (172,28-600,29)	285,00 (95,69-886,62)	<0,001
Custos com procedimentos terapêuticos <sup>(2)</sup>	NC	NC	NC	
Custos com internações hospitalares e atendimentos ambulatoriais	40,00 (20,00-105,00)	90,00 (50,00-255,00)	155,00 (40,00-589,94)	<0,001
<b>Custos totais</b>	<b>64,37 (26,25-250,11)</b>	<b>318,24 (190,99-724,38)</b>	<b>432,42 (174,14-1338,94)</b>	<b>&lt;0,001</b>

IC 95%= intervalo de confiança de 95%; IQR= intervalo interquartil; NC= não computado.

\* média geométrica

\*\* mediana

<sup>(1)</sup> exames complementares, biópsias, exames de imagem

<sup>(2)</sup> Quimioterapia, radioterapia, cirurgias. Excluindo o valor da hormonioterapia com IA.

## Capítulo VIII – Discussão

---

## **8. Discussão**

É incontestável que o uso dos inibidores da aromatase no câncer de mama está consolidado na prática médica, e que apesar dos seus efeitos adversos serem muito impactantes, esse grupo de medicamentos vem cada vez mais tendo suas indicações de uso ampliadas, em novos cenários clínicos onde os benefícios estão sendo comprovados.

Ainda que a superioridade clínica dos inibidores da aromatase esteja embasada em evidências sólidas, muitas pacientes apresentam falha ao tratamento ou mesmo desenvolvem resistência a ele. Ao mesmo tempo não se pode negar que, em virtude do seu espectro e gravidade de efeitos adversos, um percentual significativo das pacientes que iniciam o tratamento com inibidores da aromatase não conseguem completá-lo. Além disso, o custo dessas medicações é bastante superior à outra opção disponível, o tamoxifeno.

Nesse contexto, esse trabalho buscou contribuir em três áreas consideradas fundamentais a respeito do uso dos inibidores da aromatase no tratamento do câncer de mama no Brasil:

(1) pesquisa de fatores genéticos envolvidos na resposta clínica ao tratamento (eficácia) observada com o uso dessas medicações;

(2) pesquisa de fatores genéticos envolvidos no surgimento dos principais efeitos adversos observados após o uso dessas medicações;

(3) análise de custo do uso dessas medicações no cenário da saúde pública brasileira.

### **8.1 Farmacogenética da resposta clínica aos inibidores da aromatase**

O uso de inibidores da aromatase vem a cada ano aumentando mundialmente, de forma proporcional ao aumento da incidência do câncer de mama (Hadfield & Newman, 2012). Além disso, ensaios clínicos mais detalhados vem ampliando as indicações terapêuticas desse grupo de fármacos, permitindo que um espectro maior de mulheres com câncer de mama se beneficiem dos seus efeitos anti-neoplásicos. No entanto, o tratamento atual com inibidores da aromatase possui uma série de desafios a serem superados, especialmente no que tange à variabilidade das taxas de resposta terapêutica. A relação clínica

benefício-risco desempenha um papel essencial na manutenção da adesão do paciente, ainda não havendo biomarcadores específicos para indicação (ou não) dessa medicação, além da tradicional imunohistoquímica tumoral para os receptores hormonais de estrogênio e progesterona.

Até o momento, alguns polimorfismos *CYP19A1* foram associados à modificação da atividade enzimática da aromatase, levando a modificações nos níveis séricos hormonais, como as variantes rs6493497 e rs7176005 que parecem estar associadas com o aumento das concentrações de estradiol após o tratamento com anastrozol (Wang et al, 2010). Interessantemente, nosso trabalho encontrou associação do rs7176005 com um menor índice de sobrevida livre de doença (OR=0,42, p=0,036), vindo ao encontro da hipótese de que esse polimorfismo, ao ter efeito na atividade enzimática da aromatase e influenciando os níveis hormonais no tecido tumoral, possa modificar a eficácia dos inibidores da aromatase. Além desse desfecho que se mostrou estatisticamente significativo, cabe referir que o mesmo polimorfismo, assim como o rs6493497, estiveram associados em nosso estudo a um maior índice de recidiva em mulheres homozigotas (OR=2,69, p=0,009 e OR=2,19, p=0,04, respectivamente) em análise de regressão logística univariada, resultado que não se sustentou após a correção por variáveis como uso de quimioterapia adjuvante, mas que talvez em outros estudos com maior tamanho amostral maior e com caracterização clínica mais bem delimitada possam ser confirmados.

Nosso trabalho também encontrou um risco maior de sobrevida livre de doença em mulheres homozigotas para o rs700519 (OR=4,95, p=0,041), achado que vem ao encontro de trabalhos anteriormente publicados que indicam que esse polimorfismo está associado a uma menor atividade enzimática da aromatase (Ma et al, 2005), mas que até o momento não havia sido correlacionada a desfecho clínico a respeito do uso de inibidores da aromatase (Turkistani & Marsh, 2012).

Dessa forma, pela análise de mais de 200 pacientes brasileiras com câncer de mama, tratadas com inibidores da aromatase em três dos principais hospitais públicos do estado do Rio Grande do Sul, analisamos 18 polimorfismos (rs700518, rs4775936, rs60271534, rs4646, rs10459592, rs6493497, rs7176005,

rs10046, rs2236722, rs28757184, rs700519, rs56658716, rs9322336, rs9340835, rs11849538, rs2369049, rs2830 e rs605059) de um total de quatro genes envolvidos nas rotas metabólicas do mecanismo de ação dos inibidores da aromatase (*CYP19A1*, *HSD17B1*, *ESR1* e *TCL1A*) e encontramos evidências que algumas dessas variantes genéticas estão associadas a desfechos clínicos nessas mulheres, de forma independente de outros fatores.

Embora este seja um interessante começo nessa linha de pesquisa, fica bastante evidente a grande necessidade de ampliação dos estudos com o objetivo maior de validar esses resultados iniciais. Dessa forma, a ampliação do nosso tamanho amostral, bem como o detalhamento fino das características clínicas dessas pacientes, principalmente quando feita de forma prospectiva e direcionada, poderão determinar a utilidade do rastreio genético através de um painel de polimorfismos antes da prescrição um inibidor da aromatase específico no tratamento do câncer de mama. Evidentemente, a utilização da farmacogenética no tratamento com inibidores da aromatase ainda requer muita pesquisa e tempo para que esses promissores resultados possam ser traduzidos em práticas na rotina assistencial de milhares de pacientes.

## **8.2 Farmacogenética dos efeitos adversos dos inibidores da aromatase**

Um dos benefícios do uso dos inibidores da aromatase é a possibilidade de extensão do período de tempo em que as pacientes podem fazer uso da medicação para evitar a recorrência do câncer de mama, diferentemente do tamoxifeno que é eficaz por um período finito de tempo (Turkistani & Marsh, 2012). No entanto, uma das principais causas de redução da adesão ao tratamento com inibidores da aromatase (tanto a longo, quanto curto prazo) é a ocorrência de efeitos adversos, o que conseqüentemente também compromete a eficácia dessas medicações. Sabidamente, os estrógenos exercem um papel fundamental no homeostase óssea, havendo uma significativa perda de massa óssea quando da cessação da produção desses hormônios na menopausa. Como a depleção desses níveis hormonais são efeitos esperados do uso de inibidores da aromatase, efeitos colaterais dessa ordem são esperados e bastante



freqüentes nessas mulheres. Além disso, outros efeitos colaterais correlatos a esse, evidentemente com a mesma base fisiopatológica, como fogachos (sintomas vasomotores em geral), dores articulares e mialgias também são comuns em usuárias de inibidores da aromatase. Dessa forma, tal como acontece com a maioria dos tratamentos anti-neoplásicos, tem havido uma ênfase muito grande na tentativa de encontrar marcadores farmacogenéticos que possam prever eventos adversos nas pacientes antes de escolha do tratamento, permitindo a seleção individualizada do melhor fármaco para uma paciente específica, ou ainda uma dose diferenciada para a mesma, com intuito de melhorar a probabilidade de adesão à medicação.

Alguns trabalhos já publicados mostraram a associação de efeitos adversos com polimorfismos do gene *CYP19A1*. Em nossa pesquisa, através da análise de diferentes variantes genéticas nesse gene, encontramos uma associação estatisticamente significativa entre o rs7176005 e a ocorrência de sintomas vasomotores (em especial, fogachos) em mulheres com câncer mama tratadas com IA ( $p=0,038$ ), corroborando os achados publicados por Fontein et al (2014), que também encontraram associação entre esse SNP e o mesmo desfecho. Além disso, nosso trabalho identificou que mulheres homozigotas G/G para o rs10046 apresentam uma menor ocorrência de sintomas de disfunção articular ( $p=0,022$ ), algo que já havia sido indicado pelo trabalho de Mao et al (2011), ainda que não de forma estatisticamente significativa e que viemos a confirmar. Além disso, o nosso grupo foi o primeiro a encontrar associação entre o rs2830 e maior ocorrência de osteoporose em mulheres com CM tratadas com IA. O rs2830 está no gene *HSD17B1*, responsável pela codificação da enzima hidroxisteróide-17-beta-desidrogenase que realiza a conversação de androstenediona a testosterona, assim como de estrona em estradiol, em todos os tecidos (Desta et al, 2009), mostrando que polimorfismos que interfiram na sua atividade catalítica, possam estar associados a variações dos níveis hormonais e assim relacionados a ocorrência de efeitos adversos decorrentes destes.

### **8.3 Farmacoeconomia dos inibidores da aromatase**

A crescente introdução de novas tecnologias tem sido acompanhada por um aumento constante nos gastos no setor saúde, em nível mundial, fazendo com que as análises econômicas se tornem cada vez mais fundamentais para a alocação racional e eficiente dos recursos. Isso vem a ser ratificado por meio da Política Nacional de Gestão de Tecnologia em Saúde e da Lei nº 12.401 que reforçaram ainda mais que as tomadas de decisão relativas às tecnologias em saúde devem basear-se em evidências científicas sobre eficácia, acurácia, segurança, assim como na avaliação econômica comparativa dos benefícios e custos em relação às já incorporadas (Vianna & Caetano, 2005).

Nosso trabalho veio a acrescentar informações de custos reais, mensuradas em três hospitais terciários da rede pública de saúde e referência no atendimento de mulheres com câncer de mama em nosso estado. Essas informações coletadas diretamente dos registros médicos forneceram pela primeira vez dados relativos a quantidade de atendimentos médicos, número e tipo de exames realizados, bem como medidas terapêuticas associadas (como cirurgias, quimioterapia e radioterapia) realizadas em pacientes sob tratamento com inibidores da aromatase, informando sobre os custos além dos inerentes ao próprio medicamento, dentro da perspectiva do SUS, utilizando os valores ressarcidos aos hospitais com base no SIGTAP (Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS).

Dessa forma, encontramos uma diferença significativa entre os três inibidores da aromatase ( $p=0,014$ ), com o custo final mensal para tratamento do câncer de mama com uso de anastrozol de R\$188,03 (IQR=87,94-313,63), significativamente inferior ao custo de tratamento com letrozol (mediana R\$244,44; IQR=151,42-432,95) ( $p=0,026$ ). Com relação ao exemestano, essa diferença não encontrou significância estatística, muito provavelmente devido ao reduzido número de pacientes em uso dessa medicação em nossa amostra (menos de 10% dos casos). Ainda que seja um primeiro estudo, e com limitações inerentes a esse tipo de trabalho, nossos achados parecem indicar que pacientes tratadas com anastrozol parecem ter um custo inferior de tratamento (incluindo despesas com procedimentos terapêuticos, diagnósticos, internações hospitalares

e consultas ambulatoriais), independente do hospital onde se mantinham em acompanhamento.

Os resultados, além de fornecerem base real para futuros estudos de custo-efetividade no cenário da saúde pública brasileira, indicam que independente dos custos da própria medicação, pode haver diferenças monetárias significativas quando contabilizados os demais custos relativos ao tratamento desses pacientes. A importância da realização deste trabalho foi a possibilidade de se analisar o impacto financeiro dos diferentes inibidores da aromatase em mulheres brasileiras, na perspectiva do Sistema Único de Saúde. As informações são relevantes para os tomadores de decisão, possibilitando intervenções com mais efetividade na alocação dos sempre escassos recursos disponíveis para saúde, inclusive com possibilidades de estudo dos limiares desta intervenção, nas faixas etária de interesse ou contextos clínicos diferentes dos aqui estudados.



## Capítulo IX – Perspectivas

---



## 9. Perspectivas

O trabalho desenvolvido e apresentado aqui mostrou a relevância da farmacogenética na implementação de novas tecnologias para a personalização do tratamento do câncer de mama, em particular no que se refere ao uso de inibidores da aromatase na população brasileira.

A ampliação desta incipiente linha de pesquisa no mundo, e em especial no Brasil, permitirá que novos biomarcadores sejam incorporados na individualização da hormonioterapia com inibidores da aromatase hoje disponível de uma forma muito mais contumaz. Para tanto, é necessário o prosseguimento desse estudo tanto com a ampliação do número de pacientes, bem como com o desenvolvimento de novas pesquisas com delineamento prospectivo, onde desfechos clínicos bem delimitados possam ser correlacionados com as variantes genéticas aqui descritas, além da inclusão de novos genes potencialmente relacionados à eficácia dos inibidores da aromatase ou aos efeitos adversos destes. Adicionalmente, a partir dos dados obtidos, espera-se também ser possível o delineamento de estratégias mais efetivas para o tratamento dessas pacientes, através do desenvolvimento de algoritmos clínicos que orientem a melhor indicação do uso dos inibidores da aromatase, bem como as medidas preventivas que tenham que ser, porventura, tomadas para determinado grupo de pacientes.

Uma oportunidade de investigação que surge em decorrência do trabalho aqui apresentado é a investigação dos polimorfismos aqui estudados como fator de risco para ocorrência de câncer de mama em mulheres brasileiras. Sabe-se que a aromatase, importante enzima na síntese de estrógenos, pode estar envolvida na etiologia do câncer de mama, com algumas pesquisas internacionais indicando que variantes no gene que a codifica (*CYP19A1*) possam ser fatores de predisposição para essa doença, algo ainda não estudado de forma ampla em nossa população.

Com relação aos aspectos econômicos abordados nessa tese, eles indicam a necessidade maiores estudos na área, onde por meio dos dados concretos aqui coletados possa se realizar estudos de custo-efetividade sólidos que embasem de forma adequada a alocação dos poucos recursos disponíveis na

saúde pública de nosso país. É interessante salientar que com a identificação de variantes genéticas preditoras de desfechos clínicos e efeitos adversos, a implementação desses resultados de pesquisa na prática clínica tenha de ser avaliada. Abre-se, então, a perspectiva de se realizar a avaliação econômica da testagem das variantes genéticas estudadas sobre os custos no SUS com inibidores da aromatase, e assim, futuramente, desenvolver um modelo *markoviano* de análise das variantes genéticas sobre o impacto econômico nos sistemas de saúde de quimioterápicos de alto custo, usando como exemplo os inibidores da aromatase.

Desse modo, o término dessa tese de Doutorado abre perspectivas relevantes e importantes para o prosseguimento dessa linha de pesquisa nas duas diferentes áreas abordadas, seja no que tange aos aspectos farmacogenéticos como farmacoeconômicos do uso dos inibidores da aromatase no tratamento do câncer de mama.



## **Capítulo X – Referências Bibliográficas**

---

## 10. Referências Bibliográficas

Abrams JS, Phillips PH, Friedman MA: Meeting highlights: a reappraisal of research results for the local treatment of early stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87 (24): 1837-45, 1995.

Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al.: Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 276 (22): 1818-22, 1996.

Alexander DD, Morimoto LM, Mink PJ, et al. Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. *Nutr Res Rev* 2010;25:1.

Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A, Marcos-Gragera R, Stiller C, Azevedo E Silva G, Chen WQ, Ogunbiyi OJ, Rachet B, Soeberg MJ, You H, Matsuda T, Bielska-Lasota M, Storm H, Tucker TC, Coleman MP; the CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2014 Nov 26. pii: S0140-6736(14)62038-9. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62038-9.

Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, Fares MY, Stone A, Kadlubar FF, Hutchins LF. Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7130-5.

Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, Coles B, Trovato A. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):1105-11.

Amend KL, Choi JY, Ambrosone CB (2008) Role of Genetic Variability in Breast Cancer Treatment Outcomes. In: Leyland-Jones B (ed) *Pharmacogenetics of Breast Cancer: Towards the Individualization of Therapy*. Informa Healthcare, NY, USA.

American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2009–2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc. World Wide Web URL: [www.cancer.org](http://www.cancer.org).

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR et al. Effects of conjugated, equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy—the women’s health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 1701–1712.

Anker G, Lønning PE, Ueland PM et al. Plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine in post-menopausal women with breast cancer treated with tamoxifen. *Int J Cancer* 1995; 60: 365–368.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 222 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.

Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, et al.: Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med* 345 (19): 1378-87, 2001.

Barros AJ, Bertoldi AD. Out-of-pocket health expenditure in a population covered by the Family Health Program in Brazil. *Int J Epidemiol.* 2008;37(4):758-65.

Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003;362(9382):419.

Berka K, Hendrychová T, Anzenbacher P, Otyepka M (2011) Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site. *J Phys Chem A* 115: 11248-11255.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene.* 1996 Nov 7;13(9):1919-25.

Bliss JM, Kilburn LS, Coleman RE, Forbes JF, Coates AS, Jones SE, Jassem J, Delozier T, Andersen J, Paridaens R, van de Velde CJ, Lønning PE, Morden J, Reise J, Cisar L, Menschik T, Coombes RC. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 1;30(7):709-17.

Bluemke DA, Gatsonis CA, Chen MH, et al. Magnetic resonance imaging of the breast prior to biopsy. *JAMA* 2004;292(22):2735.

Boccardo F, Guglielmini P, Bordonaro R, Fini A, Massidda B, Porpiglia M, Roagna R, Serra P, Orzalesi L, Ucci G, Rubagotti A. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: long term results of the Italian Tamoxifen Anastrozole trial. *Eur J Cancer.* 2013 May;49(7):1546-54.

Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(8):793.

Breast Cancer Treatment (PDQ®). Health Professional Version. Last Update: January 2, 2015. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032676/>]

Brufsky A, Bundred N, Coleman R et al. Integrated analysis of zoledronic acid for prevention of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole. *Oncologist* 2008;13: 503–514.

Burstein HJ, Harris JR, Morrow M (2011) Malignant Tumors of the Breast. In: DeVita, Hellman, and Rosenberg's (orgs) *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 9th Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, Bines J, Takatsuka Y, Petrakova K, Dube P & de Oliveira CT 2006 Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer – The Pre-Operative 'Arimidex' Compared to Tamoxifen (PROAC7) trial. *Cancer* 106 2095–2103.

Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ et al. (2006) Chapter 51: Antineoplastic agents. In: Goodman & Gilman – *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Bruton LL, Lazo JS, Parker KL (Eds). Mc Graw Hill, 11<sup>th</sup> edition, pp1384-1387.

Chang J, Hilsenbeck SG. Prognostic and predictive markers. In: Harris LM Jr, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010:443.

Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, Peterson LE, Schildkraut JM, Isaacs C, Peshkin BN, Corio C, Leondaridis L, Tomlinson G, Dutson D, Kerber R, Amos CI, Strong LC, Berry DA, Euhus DM, Parmigiani G. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol*. 2006;24:863–71.

Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*. 2007;25:1329–33.

Chia S, Gradishar W, Mauriac L, Bines J, Amant F, Federico M, Fein L, Romieu G, Buzdar A, Robertson JF et al. Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFECT. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26: 1664–1670.

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003;289(24):3243.

Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, Nixon DW, Shapiro A, Hoy MK, Goodman MT, Giuliano AE, Karanja N, McAndrew P, Hudis C, Butler J, Merkel D, Kristal A, Caan B, Michaelson R, Vinciguerra V, Del Prete S, Winkler M, Hall R, Simon M, Winters BL, Elashoff RM. Dietary fat reduction and breast cancer

outcome: interim efficacy results from the Women's Intervention Nutrition Study. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 20;98(24):1767-76.

Cho BH, Park BL, Kim LH, et al. Highly polymorphic human CYP4A11 gene. *J Hum Genet* 2005;50:259-63.

Clarke M, Collins R, Darby S, et al.: Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366 (9503): 2087-106, 2005.

Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, Valero V, Buzdar AU, Kuerer H, Buchholz TA, Hortobagyi GN. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 1;23(1):41-8. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2013 Aug 10;31(23):2977. Buccholz, Thomas A [corrected to Buchholz, Thomas A].

Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; 25: 486–492.

Coleman R, de Boer R, Eidtmann H, et al.: Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. *Ann Oncol* 24 (2): 398-405, 2013.

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. *Lancet Oncol.* 2012 Nov;13(11):1141-51.

Colleoni M, Gelber S, Goldhirsch A, et al.: Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 13-93. *J Clin Oncol* 24 (9): 1332-41, 2006.

Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, Calvo L, Carabantes F, Crespo C, Muñoz M, Llombart A, Plazaola A, Artells R, Gilabert M, Lloveras B, Alba E. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 1;14(3):811-6.

Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, Jones SE, Alvarez I, Bertelli G, Ortmann O, Coates AS, Bajetta E, Dodwell D, Coleman RE, Fallowfield LJ, Mickiewicz E, Andersen J, Lønning PE, Cocconi G, Stewart A, Stuart N, Snowdon CF, Carpentieri M, Massimini G, Bliss JM, van de Velde C; Intergroup Exemestane Study. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):1081-92.

Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 559–570.

Crowley JJ, Sullivan PF, McLeod HL. Pharmacogenomic genome-wide association studies: lessons learned thus far. *Pharmacogenomics*. 2009 Feb;10(2):161-3.

Culhane AC, Schwarzl T, Sultana R, Picard KC, Picard SC et al. (2010) GeneSigDB--a curated database of gene expression signatures. *Nucleic Acids Res* 38: D716-D725.

Cybulski C, Górski B, Gronwald J, Huzarski T, Byrski T, Debniak T, Jakubowska A, Wokołarczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, Stawicka M, Godlewski D, Kwias Z, Antczak A, Krajka K, Lauer W, Sosnowski M, Sikorska-Radek P, Bar K, Klijer R, Romuald Z, Małkiewicz B, Borkowski A, Borkowski T, Szwiec M, Posmyk M, Narod SA, Lubiński J. BRCA1 mutations and prostate cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev*. 2008;17:62–6.

Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH (2011) Pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism part 2. *Oncologist* 16: 820-834.

Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, Daly MJ, Goldstein DB, John S, Nelson MR, Graham J, Park BK, Dillon JF, Bernal W, Cordell HJ, Pirmohamed M, Aithal GP, Day CP; DILIGEN Study; International SAE Consortium. HLA-B\*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):816-9.

Darby S, McGale P, Correa C, et al.: Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 378 (9804): 1707-16, 2011.

Davies C, Pan H, Godwin J, et al.: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381 (9869): 805-16, 2013.

de Leon J, Susce MT, Johnson M, Hardin M, Maw L et al. (2009) DNA microarray technology in the clinical environment: the AmpliChip CYP450 test for CYP2D6 and CYP2C19 genotyping. *CNS Spectr* 14:19-34.

Dent S, Hopkins S, Di Valentin T et al. Adjuvant aromatase inhibitors in early breast cancer—toxicity and adherence. Important observations in clinical practice. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106 (Suppl 1): S111 (Abstr 2079).

Desta Z, Nguyen A, Flockhart D, Skaar T, Fletcher R, Weinshilboum R, Berlin DS, Klein TE, Altman RB. Antiestrogen pathway (aromatase inhibitor). *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Jul;19(7):554-5.

Desta Z, Kreutz Y, Nguyen AT, et al. Plasma letrozole concentrations in postmenopausal women with breast cancer are associated with CYP2A6 genetic variants, body mass index, and age. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:693-700.

Dillon DA, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: *Diseases of the Breast, 4th*, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2009. p.386.

Dixon JM, Renshaw L, Macaskill EJ, Young O, Murray J, Cameron D, Kerr GR, Evans DB, Miller WR. Increase in response rate by prolonged treatment with neoadjuvant letrozole. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jan;113(1):145-51.

Doll R. Epidemiological evidence of the effects of behaviour and the environment on the risk of human cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:3.

Dowsett M, Cuzick J, Ingle J et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol* 2010; 28: 509–518.

Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Hills M, Walsh G et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2007, 99: 167–170.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute* 2011a, 103: 1656–1664.

Dowsett M, Smith I, Robertson J, Robison L, Pinhel I, Johnson L, Salter J, Dunbier A, Anderson H, Ghazoui Z. Endocrine therapy, new biologicals, and new study designs for presurgical studies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2011b: 120–123.

Drummond MF, Sculper MJ, Torrance GW, O'Brien B, Stoddart GL. *Methods for Economic Evaluation of Health Care Programmes*. Oxford: Oxford University Press, 2005.

Dubsky PC, Jakesz R, Mlineritsch B, Pöstlberger S, Samonigg H, Kwasny W, Tausch C, Stöger H, Haider K, Fitzal F, Singer CF, Stierer M, Sevelda P, Luschin-

Ebengreuth G, Taucher S, Rudas M, Bartsch R, Steger GG, Greil R, Filipcic L, Gnant M. Tamoxifen and anastrozole as a sequencing strategy: a randomized controlled trial in postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 1;30(7):722-8.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (9472): 1687-717, 2005.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 355 (9217): 1757-70, 2000.

Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, Llombart-Cussac A, Eremin J, Vinholes J, Mauriac L, Ellis M, Lassus M, Chaudri-Ross HA, Dugan M, Borgs M; Letrozole Neo-Adjuvant Breast Cancer Study Group. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: A randomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol*. 2001 Nov;12(11):1527-32.

Eifel P, Axelson JA, Costa J, et al.: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 93 (13): 979-89, 2001.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 2002 Sep;41(3A):154-61

Ehmer U, Vogel A, Schutte JK, et al. Variation of hepatic glucuronidation: novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 2004;39:970-7

Eastell R, Adams JE, Coleman RE et al. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1051–1058.

Ferraldeschi R, Arnedos M, Hadfield KD, A'Hern R, Drury S, Wardley A, Howell A, Evans DG, Roberts SA, Smith I, Newman WG, Dowsett M. Polymorphisms of CYP19A1 and response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(3):1191-8.

Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008: cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide . Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.



Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Médioni J, Genin P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P, Jouve M, Thiery JP, Sastre-Garau X. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*. 2004 Feb;40(3):336-41.

Fisher B, Jeong JH, Bryant J, et al.: Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet* 364 (9437): 858-68, 2004.

Fisher B, Redmond C, Legault-Poisson S, et al.: Postoperative chemotherapy and tamoxifen compared with tamoxifen alone in the treatment of positive-node breast cancer patients aged 50 years and older with tumors responsive to tamoxifen: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-16. *J Clin Oncol* 8 (6): 1005-18, 1990.

Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al.: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 347 (16): 1233-41, 2002.

Fleeman N, Martin Saborido C, Payne K, Boland A, Dickson R, Dundar Y, Fernández Santander A, Howell S, Newman W, Oyee J, Walley T. 2011. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of genotyping for CYP2D6 for the management of women with breast cancer treated with tamoxifen: a systematic review. *Health Technol Assess* 15(33):1-102.

Flockhart DA, Oesterheld JR (2000) Cytochrome P450-mediated drug interactions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 9: 43-76.

Fonseca M, Araújo GT, Saad ED. Cost-effectiveness of anastrozole, in comparison with tamoxifen, in the adjuvant treatment of early breast cancer in Brazil. *Rev Assoc Med Bras*. 2009 Jul-Aug;55(4):410-5.

Fontein DB, Houtsma D, Nortier JW, Baak-Pablo RF, Kranenbarg EM, van der Straaten TR, Putter H, Seynaeve C, Gelderblom H, van de Velde CJ, Guchelaar HJ. Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Apr;144(3):599-606.

Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M, Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2008 Jan;9(1):45-53.

Garcia-Casado Z, Guerrero-Zotano A, Llombart-Cussac A, Calatrava A, Fernandez-Serra A, Ruiz-Simon A, Gavila J, Climent MA, Almenar S, Cervera-Deval J, Campos J, Albaladejo CV, Llombart-Bosch A, Guillem V, Lopez-Guerrero JA. A polymorphism at the 3'-UTR region of the aromatase gene defines a

subgroup of postmenopausal breast cancer patients with poor response to neoadjuvant letrozole. *BMC Cancer*. 2010 Feb 9;10:36.

Garrison L, Finley Austin MJ. The economics of personalized medicine: a model of incentives for value creation and capture. *Drug Inf J* 2007; 41:501–9.

Geisler J, Lonning PE, Krag LE et al. Changes in bone and lipid metabolism in postmenopausal women with early breast cancer after terminating 2-year treatment with exemestane: a randomised, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2968–2975.

Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, et al. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 360 (7): 679-91, 2009.

Gnant M, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G et al. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 5-year follow-up of the ABCSG-12 bone-mineral density substudy. *Lancet Oncol* 2008; 9: 840–849.

Gobbi, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *J Bras Patol Med Lab* 2012, 48 (6): 463-474.

Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, et al.: 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 382 (9897): 1021-8, 2013.

Goss PE, Powles TJ, Dowsett M, Hutchison G, Brodie AM, Gazet JC, Coombes RC. Treatment of advanced postmenopausal breast cancer with an aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione: phase II report. *Cancer Res*. 1986 Sep;46(9):4823-6.

Grover S, Kukreti R (2012) Functional Genetic Polymorphisms from Phase-II Drug Metabolizing. *Enzymes - CNS Neuroscience Ther* 18:705-706.

Guengerich FP (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21: 70-83.

Guengerich FP, Shimada T (1998) Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400: 201-213.

Hadfield KD, Newman WG. Pharmacogenetics of aromatase inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2012 Apr;13(6):699-707.

Hall, Ian, Pirmohamed, Munir. 2006. *Pharmacogenetics*. New York: Taylor & Francis Group.

Hammond S, Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV. Statistical analysis of fine needle aspiration cytology of the breast. A review of 678 cases plus 4,265 cases from the literature. *Acta Cytol* 1987;31(3):276.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol* . 2010;28(16):2784–2795.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al.: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17 (5): 1474-81, 1999.

Hayes DF, Stearns V, Rae J, Flockhart D. A model citizen? Is tamoxifen more effective than aromatase inhibitors if we pick the right patients? *J Natl Cancer Inst* 2008;100:610 –3.

Higgins MJ, Rae JM, Flockhart DA, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo CYP2D6 genetic testing? *J Natl Comp Canc Netw* 2009;7:203–13

Hoffmann C, Schulenburg JMG, EUROMET Group. The influence of economic evaluation studies

Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9453):60-2.

Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J (2008) Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Curr Med Chem* 15: 2346-2365.

Schnitt SJ. Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question? *J Clin Oncol* 2006;24(12):1797.

Humphrey LL, Helfand M, Chan BK, Woolf SH. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002; 137(5 part 1): 347-60.

INCA: Instituto Nacional de Câncer.2014. Estatísticas do Câncer: Vigilância e Fatores de Risco. Available on <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.

INCAb Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Manual de rotinas e procedimentos para registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro: INCA, 2006

INCAc. Instituto Nacional de Câncer. 2014. Registro Hospitalar de câncer. [https://irhc.inca.gov.br/files/Notas\\_tecnicas\\_final.pdf](https://irhc.inca.gov.br/files/Notas_tecnicas_final.pdf).

INCAd, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaregiones.asp?ID=5>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.

INCAe, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.

INCAf, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=13>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.

Ingelman-Sundberg M (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:52-56.

Ingle JN, Schaid DJ, Goss PE, Liu M, Mushiroda T, Chapman JA, Kubo M, Jenkins GD, Batzler A, Shepherd L, Pater J, Wang L, Ellis MJ, Stearns V, Rohrer DC, Goetz MP, Pritchard KI, Flockhart DA, Nakamura Y, Weinshilboum RM. 2010. Genome-wide associations and functional genomic studies of musculoskeletal adverse events in women receiving aromatase inhibitors. *Clin Oncol* 28(31):4674-82.

Ingle JN, Buzdar AU, Schaid DJ, et al. Variation in anastrozole metabolism and pharmacodynamics in women with early breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:3278-86.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.

Jeong S, Woo MM, Flockhart DA, Desta Z. Inhibition of drug metabolizing cytochrome P450s by the aromatase inhibitor drug letrozole and its major oxidative metabolite 4,4'-methanolbisbenzotrile in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:867-75.

Johnell O, Kanis JA, Oden A et al. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2004; 15: 38-42.

Kamdem LK, Liu Y, Stearns V, et al. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:854-69.

Kamdem LK, Flockhart DA, Desta Z. In vitro cytochrome P450-mediated metabolism of exemestane. *Drug Metab Dispos* 2011;39:98-105

Kanis JA, Johnell O, De Laet C et al. International variation in hip fracture probabilities: implications for risk assessment. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1237-1244.

Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with aBRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002;346(21):1609.

Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, Gademann G, Zuna I, von Minckwitz G. Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2664-70.

Kern KA: Sentinel lymph node mapping in breast cancer using subareolar injection of blue dye. *J Am Coll Surg* 189 (6): 539-45, 1999.

Keshava C, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 polymorphisms -- potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;160:825-41

Kilbride KE, Newman LA. Ductal carcinoma: clinical management. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the breast*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010:341.

Kircher T, Nelson J, Burdo H. The autopsy as a measure of accuracy of the death certificate. *N Engl J Med* 1985;313:1263.

Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J et al. (2004) Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 9: 442-473.

Kollias J, Elston CW, Ellis IO, et al. Early-onset breast cancer-histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 1997;75(9):1318.

Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al.: The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med* 339 (14): 941-6, 1998.

Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al.: Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11 (10): 927-33, 2010.

Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2310.

Lazarus P, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors. *Drug Metab Rev* 2010;42:182-94.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046.

Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, Riedinger JM, Fargeot P, Brunet-Lecomte P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res.* 1999;1(1):81-7.

Locker GY, Mansel R, Cella D, Dobrez D, Sorensen S, Gandhi SK. Cost-effectiveness analysis of anastrozole versus tamoxifen as primary adjuvant therapy for postmenopausal women with early breast cancer: a US healthcare system perspective. The 5-year completed treatment analysis of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106(2):229-38.

Lønning PE, Bajetta E, Murray R, Tubiana-Hulin M, Eisenberg PD, Mickiewicz E, Celio L, Pitt P, Mita M, Aaronson NK et al. Activity of exemestane in metastatic breast cancer after failure of nonsteroidal aromatase inhibitors: a phase II trial. *Journal of Clinical Oncology* 200, 18: 2234–2244.

Lønning PE, Geisler J. Indications and limitations of third-generation aromatase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 723–739

Lønning PE. The potency and clinical efficacy of aromatase inhibitors across the breast cancer continuum. *Ann Oncol.* 2011 Mar;22(3):503-14.

Lønning PE, Eikesdal HP. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jun 24;20(4):R183-201

Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L, Eckloff BW, Schaid D, Wieben ED, Weinshilboum RM. 2005. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res* 65(23):11071-82.

Majid AS, de Paredes ES, Doherty RD, Neil R, Sharma NR, Salvador X. Missed Breast Carcinoma: Pitfalls and Pearls. *RadioGraphics* 2003; 23: 881-95.

Mano M. The burden of scientific progress: growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncol.* 2006;45(1):84-6.

Mansel R, Locker G, Fallowfield L, Benedict A, Jones D. Cost-effectiveness analysis of anastrozole vs tamoxifen in adjuvant therapy for early stage breast cancer in the United Kingdom: the 5-year completed treatment analysis of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen alone or in combination) trial. *Br J Cancer.* 2007;97(2):152-61.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 523–534.

Mansour EG, Gray R, Shatila AH, et al.: Survival advantage of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer: ten-year analysis--an intergroup study. *J Clin Oncol* 16 (11): 3486-92, 1998.

Mao JJ, Su HI, Feng R, Donelson ML, Aplenc R, Rebbeck TR, Stanczyk F, DeMichele A. Association of functional polymorphisms in CYP19A1 with aromatase inhibitor associated arthralgia in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*. 2011 Jan 20;13(1):R8.

Marsh S, Somlo G, Li X, Frankel P, King CR, Shannon WD, McLeod HL, Synold TW. Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast cancer. *Pharmacogenomics J*. 2007 Oct;7(5):362-5.

Martin DN, Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Mechanic LE, Chanock SJ, Ambros S. Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival. *BMC Cancer*. 2006 Oct 27;6:257.

Martin RC, Ahn J, Nowell SA, Hein DW, Doll MA, Martini BD, Ambrosone CB. Association between manganese superoxide dismutase promoter gene polymorphism and breast cancer survival. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R45.

McCabe C, Claxton K, O'Hagan A. Why licensing authorities need to consider the net value of new drugs in assigning review priorities: addressing the tension between licensing and reimbursement. *Int J Technol Assess* 2008;24:140 –5.

McGraw J, Waller D (2012) Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8: 371-382.

McLean KJ, Sabri M, Marshall KR, Lawson RJ, Lewis DG et al. (2005) Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* 33: 796-801.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005;97(16):1180.

Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:230–6.

Melbye M, Wohlfahrt J, Olsen JH, et al. Induced abortion and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997;336(2):81.

Metcalf KA, Finch A, Poll A, et al. Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Br J Cancer* 2009;100(2):421.

Mikhailova ON, Gulyaeva LF, Prudnikov AV, et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms in the assessment of female hormone-dependent cancer risk. *Pharmacogenomics J* 2006;6:189-93

Moeremans K, Annemans L. Cost-effectiveness of anastrozole compared to tamoxifen in hormone receptor-positive early breast cancer. Analysis based on the ATAC trial. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(Suppl 2):576-8.

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Janicke F et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology* 2001, 19: 2596–2606.

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology* 2003, 21: 2101–2109.

Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thürlimann B, Paridaens R, Smith I, Mauriac L, Forbes J, Price KN, Regan MM, Gelber RD, Coates AS, BIG 1-98 Collaborative Group. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 Aug 20;361(8):766-76.

MS-INCA. <https://mortalidade.inca.gov.br/>. Acessado em 29 de Dezembro de 2014.

Murai K, Yamazaki H, Nakagawa K, et al. Deactivation of anti-cancer drug letrozole to a carbinol metabolite by polymorphic cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. *Xenobiotica* 2009;39:795-802 48.

Napoli N, Villareal DT, Mumm S, et al. Effect of CYP1A1 gene polymorphisms on estrogen metabolism and bone density. *J Bone Miner Res* 2005;20:232-9

Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* 2006; 25(43): 5832.

Newman W (2010) Principles of Genetics and Pharmacogenetics, chapter 3. In: Newman W (ed) *Pharmacogenetics: Making Cancer Treatment Safer and More Effective*. Springer, pp 40-43.

Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(5):888.



Nowell S, Sweeney C, Winters M, Stone A, Lang NP, Hutchins LF, Kadlubar FF, Ambrosone CB. Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Nov 6;94(21):1635-40.

Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, MacLeod SL, Kadlubar FF, Ambrosone CB. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Jun;91(3):249-58.

Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2716.

Olopade OI, Grushko TA, Nanda R, Huo D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):7988-99.

Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensch N, Galimberti V, Luini A, Brenelli F, Gatti G, Viale G. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7):1511-20.

Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, et al.: Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N Engl J Med* 337 (14): 949-55, 1997.

Owen JR, Ashton A, Bliss JM, et al.: Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial. *Lancet Oncol* 7 (6): 467-71, 2006.

Park IH, Lee YS, Lee KS, Kim SY, Hong SH, Jeong J, Lee H, Ro J, Nam BH. Single nucleotide polymorphisms of CYP19A1 predict clinical outcomes and adverse events associated with letrozole in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Nov;68(5):1263-71.

Parkin D, Bray F. International patterns of cancer incidence and mortality. In: Schottenfeld D, Fraumeni JJ, eds. *Cancer Epidemiology and prevention*, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006:101.

Partridge AH, LaFountain A, Mayer E et al. Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 556–562.

Patterson LH, McKeown SR, Robson T, Gallagher R, Raleigh SM et al. (1999) Antitumour prodrug development using cytochrome P450 (CYP) mediated activation. *Anticancer Drug Des* 14: 473-486.

Pereira J, Barbosa C. Avaliação Económica aplicada aos medicamentos. In: Farmacoeconomia: Princípios e Métodos. Pereira J (Ed). Wolters Kluwer, 2009. pp 7-20.

Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, Holmberg SB, Lindtner J, Snyder R, Thürlimann B, Murray E, Viale G, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A; International Breast Cancer Study Group. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 20; 26(18):3006-14.

Petros WP, Hopkins PJ, Spruill S, Broadwater G, Vredenburg JJ, Colvin OM, Peters WP, Jones RB, Hall J, Marks JR. Associations between drug metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):6117-25.

Pfarl G, Helbich TH, Riedl CC, et al. Stereotactic 11-gauge vacuum-assisted breast biopsy: a validation study. *AJR Am J Roentgenol* 2002;179(6):1503.

Piccart-Gebhart MJ. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(20):2177.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al.: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (16): 1659-72, 2005.

Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G et al. (2010) SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res* 38: D237-D243.

Raether W, Seidenath H, Loewe H (1978) Action of p-(4-amidinophenoxy)-benzaldehyde-p-amidino-phenylhydrazone dihydrochloride on *Leishmania donovani* infections in the golden hamster. *Ann Trop Med Parasitol* 72: 543-547.

Ragaz J, Jackson SM, Le N, et al.: Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in node-positive premenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 337 (14): 956-62, 1997.

Ramsey SD, Veenstra DL, Garrison LP, et al. Toward evidence-based assessment for coverage and reimbursement of laboratory-based diagnostic and genetic tests. *Am J Manag Care* 2006;12:197–202.

Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Fan I, Tang J, Li S, Zhang S, Shaw PA, Narod SA. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1694–706.

Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, et al.: Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg* 191 (1): 1-6; discussion 6-8, 2000.

Rocchi A, Verma S. Anastrozole is cost-effective vs tamoxifen as initial adjuvant therapy in early breast cancer: Canadian perspectives on the ATAC completed-treatment analysis. *Support Care Cancer*. 2006;14(9):917-27.

Romestaing P, Lehingue Y, Carrie C, et al.: Role of a 10-Gy boost in the conservative treatment of early breast cancer: results of a randomized clinical trial in Lyon, France. *J Clin Oncol* 15 (3): 963-8, 1997.

Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994;139(8):819.

Rubio IT, Korourian S, Cowan C, et al.: Sentinel lymph node biopsy for staging breast cancer. *Am J Surg* 176 (6): 532-7, 1998.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2003;55:68-76

Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Evidence-based Medicine: How to Practice and Teach EBM, 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone, 2000.  
on decision making. A European survey. *Health Policy* 2000; 52:179-92.

Sarasquete ME, García-Sanz R, Marín L, Alcoceba M, Chillón MC, Balanzategui A, Santamaria C, Rosiñol L, de la Rubia J, Hernandez MT, Garcia-Navarro I, Lahuerta JJ, González M, San Miguel JF. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2709-12.

Sasse AD, Sasse EC. [Cost-effectiveness analysis of adjuvant anastrozol in postmenopausal women with breast cancer]. *Rev Assoc Med Bras*. 2009 Sep-Oct;55(5):535-40.

Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM. 2009. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 302(13):1429-36.

Semiglazov V, Kletsel A, Semiglazov V, Zhiltzova E, Ivanov V, Dashyan G, Bozhok A, Melnikova O, Paltuev R & Berstein L 2005 Exemestane (E) versus tamoxifen (T) as neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with

ERC breast cancer (T2N1–2, T3N0–1, T4N0M0). *Journal of Clinical Oncology* 23 (16 Suppl) 11s (Abstr 530).

Shrubsole MJ, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Cai H, Niu Q, Gao YT, Zheng W. MTHFR genotypes and breast cancer survival after surgery and chemotherapy: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 May;91(1):73-9.

Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001;286(17):2143.

Smart CR, Hartmann WH, Beahrs OH, Garfinkel L. Insights into breast cancer screening of younger women. Evidence from the 14-year follow-up of the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *Cancer.* 1993 Aug 15;72(4 Suppl):1449-56.

Smith I, Procter M, Gelber RD, et al.: 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369 (9555): 29-36, 2007.

Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jun 12;348(24):2431-42.

Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, Ashley SE, Francis S, Boeddinghaus I & Walsh G. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* (2005) 23 5108–5116.

Solin LJ, Fowble BL, Schultz DJ, et al.: The significance of the pathology margins of the tumor excision on the outcome of patients treated with definitive irradiation for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21 (2): 279-87, 1991.

Stomper PC. Breast imaging. In: *Atlas of Breast Cancer*, Hayes DF (Ed), Mosby, Philadelphia 2000, p.54.

Stomper PC, Winston PS, Proulx CM et al. Mammographic detection and staging of carcinoma ductal in situ : mammographic-pathologic correlation. *Semin Breast Dis* 2000; 3:1.

Sun D, Chen G, Dellinger RW, et al. Characterization of 17-dihydroexemestane glucuronidation: potential role of the UGT2B17 deletion in exemestane pharmacogenetics. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:575-85

Sweeney C, Ambrosone CB, Joseph L, Stone A, Hutchins LF, Kadlubar FF, Coles BF. Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. *Int J Cancer.* 2003 Mar 1;103(6):810-4.

Sweeney C, McClure GY, Fares MY, Stone A, Coles BF, Thompson PA, Korourian S, Hutchins LF, Kadlubar FF, Ambrosone CB. Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res.* 2000 Oct 15;60(20):5621-4.

Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, Holm L, Lindh J, Rane A, Wadelius M, Deloukas P. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009 Mar;5(3):e1000433.

Tan KP, Mohamad Azlan Z, Rumaisa MP, Siti Aisyah Murni MR, Radhika S, Nurismah MI, Norlia A, Zulfiqar MA. The comparative accuracy of ultrasound and mammography in the detection of breast cancer. *Med J Malaysia.* 2014 Apr;69(2):79-85.

Tanabe K, Ishizaki J, Ando Y, Ito T, Nishimoto S (2012) Reductive activation of 5-fluorodeoxyuridine prodrug possessing azide methyl group by hypoxic X-irradiation. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 1682-1685.

Tavassoli FA, Devillee P, eds. World Health Organisation classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs . Lyon: IARC Press, 2003.

Taylor RS, Drummond MF, Salkeld G, Sullivan SD. Inclusion of cost effectiveness in licensing requirements of new drugs: the fourth hurdle. *BMJ.* 2004 Oct 23;329(7472):972-5.

Terasawa T, Dahabreh I, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic reviews on selected pharmacogenetic tests for cancer treatment: CYP2D6 for tamoxifen in breast cancer, KRAS for anti-EGFR antibodies in colorectal cancer, and BCR-ABL1 for tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. Agency for Healthcare Research and Quality Technology Assessment Report June 7, 2010. Available from: [www.cms.gov/DeterminationProcess/downloads/id76TA.pdf](http://www.cms.gov/DeterminationProcess/downloads/id76TA.pdf)

Thompson D, Easton DF. The breast cancer linkage consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1358–65.

Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1972;48(3):605.

Turkistani A, Marsh S. Pharmacogenomics of third-generation aromatase inhibitors. *Expert Opin Pharmacother.* 2012 Jun;13(9):1299-307.

van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C, Putter H, Hasenburg A, Vannetzel JM, Paridaens R, Markopoulos C, Hozumi Y, Hille ET, Kieback DG, Asmar L, Smeets J, Nortier JW, Hadji P, Bartlett JM, Jones SE. Adjuvant tamoxifen and exemestane

in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Jan 22;377(9762):321-31.

van Dongen JA, Voogd AC, Fentiman IS, et al.: Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. *J Natl Cancer Inst* 92 (14): 1143-50, 2000.

Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al.: Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet* 349 (9069): 1864-7, 1997.

Vianna CMM, Caetano R. Avaliações econômicas como um instrumento no processo de incorporação tecnológica em saúde. *Cad Saúde Colet (Rio J.)* 2005; 13:747-66.

Wang L, Ellsworth KA, Moon I, et al. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res* 2010;70:319-28.

Wazer DE, Schmidt-Ullrich RK, Schmid CH, et al.: The value of breast lumpectomy margin assessment as a predictor of residual tumor burden. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38 (2): 291-9, 1997.

Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stål O, Nordenskjöld B, Wingren S. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R7.

Weiss MC, Fowble BL, Solin LJ, et al.: Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23 (5): 941-7, 1992.

Wellington K, Faulds DM. Anastrozole: in early breast cancer. *Drugs*. 2002;62(17):2483-90.

Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P. Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. *Cancer Res* 2004;64:1190-6.

Willett WC, Tamini RM, Hankinson SE, et al. Non-genetic factors in the causation of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*, 4th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, 2010:248.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for human

epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(1):118.

Woods B, Veenstra D, Hawkins N. Prioritizing pharmacogenetic research: a value of information analysis of CYP2D6 testing to guide breast cancer treatment. *Value Health*. 2011 Dec;14(8):989-1001.

Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Jan 1;103(1):52-8.

Zhou SF, Liu JP, Chowbay B (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 41:89-295.

## Capítulo XI – Anexos

---



## 11.1 Anexo 1

### Ficha clínica do projeto

# Ficha Clínica

Paciente # \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_  
(código hospital) (número)

"Estudo farmacogenético e farmacoeconômico em pacientes brasileiras portadoras de câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase"

#### IDENTIFICAÇÃO

Nome completo: \_\_\_\_\_ No. Prontuário: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
Outros contatos (cel/email): \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Profissão: \_\_\_\_\_  Ativo  Inativa - início: \_\_\_\_\_ Quanto (meses)? \_\_\_\_\_  
Etnia (auto-declaração):  Branca  Negra  Amarelo  Parda  Indígena  Outra  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Anos de estudo: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_  
Estado civil: 1. Solteiro(a) 2. Casado(a) 3. Viúvo(a) 4. Separado(a) 5. Outro: \_\_\_\_\_  
Local de origem: (1) HCPA (2) HNSC (3) HF (4) HNV/NMPOA (5) Outro Hospital: \_\_\_\_\_

#### DIAGNÓSTICO

Data do diagnóstico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_ anos  
Menopausa pré-tratamento: (a) NÃO (b) SIM. Idade: \_\_\_\_\_ anos (c) NÃO SABE  
Dados Patologia: Tipo histológico: \_\_\_\_\_ Grau histológico: \_\_\_\_\_  
♦ IHQ: ER \_\_\_\_\_ PR \_\_\_\_\_ HER2 \_\_\_\_\_ p53 \_\_\_\_\_ Ki67 \_\_\_\_\_ Critérios de: \_\_\_\_\_  
LN comprometidos: ( ) Sim ( ) Não N°LN: \_\_\_\_\_ Estadiamento: T \_\_\_\_\_ N \_\_\_\_\_ M \_\_\_\_\_  
Metástase: ( ) Sim. Local: \_\_\_\_\_ ( ) Não

#### TRATAMENTO

( ) Cirurgia \_\_\_\_\_

#### Tratamento primário:

( ) QT neoadj ( ) QT adj ( ) RT adjuvante ( ) HT adj: (1) TAM (2) IA (3) TAM→IA

→ Dose TAM: \_\_\_\_\_

→ Motivo da interrupção de TAM: \_\_\_\_\_

( ) Desconhecido OBS.: \_\_\_\_\_

#### ◆ QUIMIOTERAPIA - ( ) sim ( ) não

Esquema	Dose	Indicação	Início (data)	Término (data)

#### ◆ INIBIDOR DE AROMATASE - ( ) sim ( ) não

IA	Dose	Indicação	Início (data)	Término (data)

#### ◆ OUTROS MEDICAMENTOS:

AINE	Dose	Indicação	Início (data)	Término (data)
Bifosfonados	Dose	Indicação	Início (data)	Término (data)
OUTROS	Dose	Indicação	Início (data)	Término (data)

## Anexo 1: continuação

### EFEITOS ADVERSOS – I.A.:

EA	Antes IA	Depois IA	Melhora/Piora	FREQUENCIA
NENHUM				
Fogachos/calorões				
Dores articulares				
Dores musculares				
Dor óssea				
Diminuição da função articular				
Reação alérgica/lesões de pele				
Osteoporose/fraturas				
Depressão/sintomas depressivos				
Insônia				
Cefaléias				
Fraqueza/astenia				
Náuseas e vômitos				
Outros (quais):				

### HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA:

- Doença 1: \_\_\_\_\_ Data diagnóstico: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Tratamento: \_\_\_\_\_
- Doença 2: \_\_\_\_\_ Data diagnóstico: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Tratamento: \_\_\_\_\_
- Doença 3: \_\_\_\_\_ Data diagnóstico: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Tratamento: \_\_\_\_\_

### SEGUIMENTO

INTERNACÕES	INÍCIO	TÉRMINO	ENFERMARIA / UTI - MOTIVO
1			
2			
3			

EXAMES COMPLEMENTARES	QUANTIDADE	MOTIVOS
Hemograma e plaquetas		
Provas de função hepática		
Rx tórax		
Rx outros		
Densitometria óssea		
RNM/TC abdome		
Biópsias		
Novas IHQ		
Outros		

CONSULTAS MÉDICAS	DATA	Obs.
1. Especialidade:		
2. Especialidade:		
3. Especialidade:		
4. Especialidade:		

### DESFECHOS

- ( ) Remissão após \_\_\_\_\_ anos  
 ( ) Recidiva local e/ou sistêmica após \_\_\_\_\_ anos  
 ( ) Sobrevida livre de doença após \_\_\_\_\_ anos  
 ( ) Óbito relacionado a doença  
 ( ) Óbito não relacionado a doença  
 ( ) Outro: \_\_\_\_\_

Data coleta de material biológico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Tipo de material: ( ) sangue ( ) saliva  
 Local da Coleta: \_\_\_\_\_  
 Responsável pelo questionário: \_\_\_\_\_

## 11.2 Anexo 2

Carta de aprovação do projeto - GPPG/HCPA



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

#### COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110164

**Versão do Projeto:** 13/04/2011

**Versão do TCLE:** 13/04/2011

**Pesquisadores:**

OSVALDO ALFONSO PINTO ARTIGALÁS


IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

**Título:** Estudo farmacogenético e farmacoeconômico em pacientes brasileiras portadoras de câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 13 de abril de 2011.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

### 11.3 Anexo 3

Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado - GPPG/HCPA

#### Apêndice A

**Estudo farmacogenético e farmacoeconômico em pacientes brasileiras portadoras de câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase.**

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica do HCPA. Rua Ramiro Barcellos, 2350 – 90035-003 – Porto Alegre-RS Tel.: 3359-8011.

#### *Justificativa e objetivo da pesquisa*

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre o sexo feminino, exigindo várias modalidades de tratamento: cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia, dependendo do seu tipo e classificação. Nos cânceres de mama em que os receptores de hormônios são positivos (estrogênio e/ou progesterona) pode-se utilizar uma classe de fármacos chamada de inibidores da aromatase, os quais agem bloqueando uma enzima (aromatase) responsável pela transformação de certos hormônios (androstenediona e testosterona) em estradiol e estrona, esse dois últimos hormônios potencializadores do desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Além disso sabe-se que uma grande quantidade de efeitos colaterais que impõem dificuldades na vida do pacientes e impossibilitam a continuidade do tratamento podem ocorrer durante o tratamento, bem como casos de pacientes que respondem de forma mais ou menos favorável a esta medicação.

Nosso objetivo nesse trabalho é analisar algumas variantes de genes que estão envolvidas no metabolismo desses medicamentos e avaliar a existência de uma possível associação entre as variantes genéticas e a resposta ao tratamento do câncer de mama com inibidores da aromatase.

#### *Procedimentos que serão realizados*

Será coletada amostra de saliva. A amostra será estudada para a análise genética conforme mencionado acima. As amostras serão armazenadas e analisadas no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, campus do Vale, e no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisas do HCPA sob a responsabilidade da Profa. Dra. Ida Schwartz e Profa. Dra. Patrícia Ashton-Prolla.

Informações clínicas sobre sua história médica serão coletadas diretamente com você ou seu médico assistente, ou através de revisão do seu prontuário hospitalar.

As amostras de material genético serão utilizadas somente para este estudo. Entretanto, pretendemos guardar as amostras após o término do estudo. Se for de interesse da equipe de pesquisa realizar novas investigações utilizando estas amostras guardadas, isto somente será realizado após novo contato e assinatura de novo termo de consentimento.

#### *Riscos, desconfortos potenciais e instruções de coleta*

Não é esperado nenhum desconforto maior durante a coleta. Entretanto, não é permitido comer, beber, mastigar pastilhas ou fumar por 30 minutos antes da coleta. A maioria das pessoas demora de 2-5 minutos para produzir a quantidade necessária saliva. Alguns indivíduos podem ter dificuldades na produção de saliva, e nesse caso, devem colocar na boca ¼ de colher de sobremesa de açúcar na boca antes da coleta. A coleta de saliva não deve exceder o período de 30 minutos.

#### *Benefícios Esperados*

Este estudo poderá no futuro beneficiar o pacientes através do aconselhamento do tratamento que mais se adequar ao perfil genético do paciente. Sabemos, entretanto, que

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

13/04/2011

11010117-1

### Anexo 3: continuação

outros fatores além dos genéticos influenciam na resposta ao tratamento do câncer de mama e efeitos colaterais.

#### **Procedimentos Alternativos**

Eu entendo que tive o direito de recusar a participar dessa pesquisa e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira meus cuidados médicos em relação ao câncer de mama.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios da presente pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- Da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade (sigilo absoluto dos dados);
- De que você ou seu familiar podem não ter algum benefício direto com esta pesquisa. Porém, com os dados gerados, pretende-se elaborar mecanismos para que melhoria do tratamento dos pacientes tenham câncer de mama e estejam sendo tratados com inibidores da aromatase.
- De que não haverá qualquer forma de ressarcimento pela participação no estudo e que o paciente não terá custo algum envolvido com a pesquisa.

Os pesquisadores responsáveis por esse projeto de pesquisa são Profa. Dra. Ida Schwartz (Fone: 51 33598011) e Osvaldo Artigalás (Fone: 51 96129215), tendo sido este documento revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujo o telefone de contato é (51) 33597615.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Concordo em participar desta pesquisa e declaro que fui informado de forma clara e detalhada sobre esta pesquisa e que tive todas as minhas dúvidas esclarecidas pelo profissional: \_\_\_\_\_. Recebi uma cópia deste documento para meus arquivos pessoais.

- ( ) Concordo com o armazenamento das minhas amostras para futuras análises  
( ) NÃO concordo com o armazenamento das minhas amostras para futuras análises

• **Paciente:**

- Nome: \_\_\_\_\_

- Assinatura: \_\_\_\_\_

• **Pesquisador responsável:**

- Nome: \_\_\_\_\_

- Assinatura: \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA  
**VERSÃO APROVADA**

13 / 04 / 2011  
110164 TRV

## 11.4 Anexo 4

### Carta de aprovação ao projeto - CEP/GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.  
Av. Francisco Trein, 596  
CEP 91259-200 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3357 2000  
CNPJ: 02.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO  
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa  
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.  
Rua Domingos Rubbo, 20  
CEP 91040-010 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3367 4100  
CNPJ: R2.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.  
Rua Moscardero, 17  
CEP 91438-011 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3314 5200  
CNPJ: 92.603.134/0001-83



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto n° 98.244/90

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 09 de janeiro de 2013, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

**Projeto:** 12-167

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

### **Pesquisadores:**

PATRÍCIA ASHTON PROLLA

OSVALDO ALFONSO PINTO ARTIGALÁS

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

**Título:** Estudo farmacogenético e farmacoeconômico em pacientes brasileiras portadoras de câncer de mama tratadas com inibidores da aromatase.

**Documentação:** Aprovada

**Aspectos Metodológicos:** Adequados

**Aspectos Éticos:** Adequados

**Parecer final:** Este projeto de pesquisa, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO neste CEP.

### **Considerações Finais:**

- Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC.
- Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.
- Entregue cópia deste documento ao Setor/Serviço onde será realizada a pesquisa.
- Solicitação de declarações, adendos ao projeto e inclusão/troca de pesquisadores serão analisadas perante a entrega do relatório parcial ou final do estudo.

Daniel Benedito Faustino de Silva  
Coordenador-geral do CEP/GHC

Porto Alegre, 09 de janeiro de 2013.

## 11.5 Anexo 5

### Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado - CEP/GHC

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulada: “ESTUDO FARMACOGENÉTICO E FARMACOECONÔMICO EM PACIENTES BRASILEIRAS PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA TRATADAS COM INIBIDORES DA AROMATASE”, que tem como objetivo principal avaliar a existência de variantes genéticas que possam estar associadas à resposta ao tratamento do câncer de mama com inibidores da aromatase, e fazer análise farmacoeconômica da sua aplicação na prática assistencial médica, avaliando o impacto econômico do incremento dessa nova tecnologia.

O tema escolhido se justifica pela relevância que o câncer de mama tem na saúde pública brasileira, tornando-se importante avaliar os fatores que possivelmente influenciem a resposta ao seu tratamento, com vistas a auxiliar na escolha da estratégia terapêutica mais adequada e eficaz, bem como aumentar a sua efetividade e custo-efetividade.

O trabalho está sendo realizado pelo Dr Osvaldo Alfonso Pinto Artigalás, médico geneticista, sob supervisão e orientação da profª Dra. Schwartz.

Para alcançar os objetivos do estudo será coletada amostra de saliva. A amostra será estudada para a análise genética dos genes que respondem ao tratamento com inibidores da aromatase. As amostras serão armazenadas e analisadas no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, campus do Vale, e no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisas do HCPA sob a responsabilidade da Profa. Dra Ida Schwartz. Informações clínicas sobre sua história médica serão coletadas diretamente com você ou seu médico assistente, ou através de revisão do seu prontuário hospitalar.


As amostras de material genético serão utilizadas somente para este estudo. Entretanto, pretendemos guardar as amostras após o término do estudo. Se for de interesse da equipe de pesquisa realizar novas investigações utilizando estas amostras guardadas, isto somente será realizado após novo contato e assinatura de novo termo de consentimento. Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados, e estes serão armazenados durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

EU \_\_\_\_\_, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.
- De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim.
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisador: Osvaldo Artigalás, telefone 96129215, email: artigalas@gmail.com e endereço: Ramiro Barcelos, 2350 Serviço de Genética Médica – Porto Alegre.
- Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3º andar, Bloco H, sala 11, das 09h às 12h e das 14h:30min às 17h.

**Versão Aprovada em**

09 JAN. 2013  
  
Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP-GHC

**Anexo 5: continuação**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com o pesquisador.

Porto Alegre, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

• **Paciente:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

• **Pesquisador responsável:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Em caso do participante com incapacidade de leitura:

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ em  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ por Osvaldo Artigalás enquanto eu estava presente.

**Assinatura da Testemunha**

**Versão Aprovada em**

09 JAN. 2013  
  
Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP-GHC