



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



---

**Monografia**

**Diagnóstico do câncer da mama através de  
marcadores tumorais séricos: uma revisão  
sistemática de literatura**

**Rodrigo Pimentel Santiago**

Salvador (Bahia)  
Maio, 2016

**FICHA CATALOGRÁFICA**

(elaborada pela Bibl. Tatiana Bonfim Sousa, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

S235 Santiago, Rodrigo Pimentel.  
Diagnóstico do câncer da mama através de marcadores tumorais séricos: uma revisão sistemática de literatura/ Rodrigo Pimentel Santiago. (Salvador, Bahia): R, santiago, 2016  
30 fl. ; il.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Murilo Pedreira Neves Júnior

Palavras chaves: 1. Câncer de mama. 2. Marcadores tumorais. 3. Diagnóstico. I. Neves, Murilo Pedreira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 618.19-006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Diagnóstico do câncer da mama através de marcadores tumorais séricos: uma revisão sistemática de literatura**

**Rodrigo Pimentel Santiago**

Professor orientador: **Murilo Pedreira  
Neves Júnior**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2015.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Maio, 2016

**Monografia:** *Diagnóstico do câncer da mama através de marcadores tumorais séricos: uma revisão sistemática de literatura*, de **Rodrigo Pimentel Santiago**.

Professor orientador: **Murilo Pedreira Neves Júnior**

**COMISSÃO REVISORA.**

- **Murilo Pedreira Neves Júnior** (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Hematologia do Complexo Hospital Professor Edgard Santos da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Alex Guedes**, Professor do Departamento de Cirurgia Experimental e Especialidades Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Maria da Glória Bomfim Arruda**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio ao Diagnóstico Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Marco Aurélio Salvino de Araújo**, Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio ao Diagnóstico Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:**

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no X Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

*“A cada canto um grande conselheiro,  
que nos quer governar cabana, e vinha,  
não sabem governar sua cozinha,  
e podem governar o mundo inteiro”.*

(extraído do poema “Descrevo que era Realmente Naquele Tempo a  
Cidade da Bahia”, de **Gregório de Matos**)

A minha querida mãe, **Maria  
Gorett**

## **EQUIPE**

- Rodrigo Pimentel Santiago, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: [ropisamed@gmail.com](mailto:ropisamed@gmail.com);
- Murilo Pedreira Neves Júnior, Professor da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

➤ Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Recursos próprios.

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Murilo Pedreira Neves Júnior**, pela presença constante e substantivas orientações acadêmicas e à minha vida profissional de futuro médico.
- ◆ Aos Doutores **Alex Guedes, Maria da Glória Bomfim Arruda e Marco Aurélio Salvino de Araújo** membros da Comissão Revisora desta Monografia, sem os quais muito deixaria de ter aprendido. Meus especiais agradecimentos pela disponibilidade.
- ◆ Aos meus colegas de faculdade, meus informais conselheiros e amigos, pelos direcionamentos e auxílios sem medidas.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURA, GRÁFICOS, QUADRO E TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
<b>IV. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA</b>	<b>8</b>
IV.1. O câncer de mama	8
IV.1.1. Classificação morfológica do câncer de mama	10
<b>V. METODOLOGIA</b>	<b>14</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
<b>VII. DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>VIII. CONCLUSÕES</b>	<b>27</b>
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>

## **ÍNDICE DE IMAGEM, FLUXOGRAMA, QUADRO E TABELA**

### **IMAGEM**

IMAGEM I. Carcinomas Ductal e Lobular *in situ*. 12

### **FLUXOGRAMA**

FLUXOGRAMA I. Processo de coleta de dados 18

### **QUADRO**

QUADRO 1. Artigos incluídos na revisão sistemática 20

### **TABELA**

TABELA I. Sistematização das informações dos artigos revisados 24

## I. RESUMO

**Diagnóstico do câncer de mama através de marcadores tumorais séricos: uma revisão sistemática de literatura.** Marcadores tumorais séricos são uma promissora possibilidade atual no auxílio diagnóstico em pacientes de risco para neoplasias. O diagnóstico por medição dessas moléculas no sangue é considerado um método não-invasivo e econômico capaz de informar não somente a presença ou ausência de doença, mas também de sua evolução. Ter informações que, em conjunto, possibilitem o uso diagnóstico rápido e acurado é fundamental para modificar o prognóstico dos pacientes portadores de câncer de mama, em especial as mulheres. Considerando a mudança das últimas décadas na expectativa de vida, há a necessidade constante, e relatada em diversos estudos, de mais análises prospectivas acerca do tema. Analisamos esse problema de saúde pública sob a perspectiva de um novo método diagnóstico, que se correlacione às medidas de tratamento mais atuais.

Palavras chave: 1. Câncer de mama; 2. Marcadores Tumorais; 3. Diagnóstico.

## **II. OBJETIVOS**

### PRIMÁRIO

Identificar marcadores tumorais úteis no diagnóstico do câncer da mama;

### SECUNDÁRIO

Avaliar qual ou quais marcadores são de utilidade clínica diagnóstica.

### III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### Marcadores Tumorais

Marcadores tumorais podem ser definidos como moléculas que indicam a presença de câncer ou fornecem informações sobre seu provável comportamento no futuro. Isto é, são produtos moleculares metabolizados e secretados pelo tecido neoplásico e caracterizados bioquimicamente nas células ou nos fluidos corporais<sup>7,8</sup>. Eles são também indicadores de estágio do tumor e seu grau, sendo úteis para diagnosticar, monitorar as respostas ao tratamento e prever a recorrência dos carcinomas. Em pacientes assintomáticos, são potencialmente úteis no diagnóstico em estágios iniciais, enquanto nos pacientes com sintomas, podem ajudar na diferenciação entre doença maligna ou benigna<sup>9</sup>. Essas moléculas são de muitos grupos químicos incluindo hormônios, antígenos, e ácidos nucleicos. Independentemente da sua aplicação, o marcador tumoral ideal deve apresentar as seguintes características: possuir um valor preditivo positivo e negativo altos; ter um teste laboratorial barato, simples, padronizado e automatizado com limites de referência claramente definidos; ser aceitável para indivíduos submetidos a teste e ter seu valor clínico validado em um grande estudo prospectivo. Esse “marcador tumoral ideal” não existe atualmente<sup>9</sup>, não existe no Brasil<sup>10</sup>, e a maioria dos marcadores disponíveis erra pela falta de especificidade e sensibilidade. Contudo, vários marcadores atualmente são indispensáveis no manejo clínico dos pacientes com câncer. Um ótimo exemplo é do Antígeno Prostático Específico (PSA), que é usado no auxílio diagnóstico da neoplasia prostática<sup>11</sup>. Comparado a testes de rastreio já estabelecidos como a mamografia, o uso de marcadores tumorais tem vantagens práticas em rastreio do câncer de mama<sup>12</sup>.

Essas vantagens incluem<sup>11,12</sup>: os marcadores podem ser medidos em fluidos corporais tais como urina e sangue, que podem ser obtidos com um mínimo de inconvenientes para os indivíduos submetidos ao rastreio.

Para muitos marcadores, ensaios automatizados estão disponíveis, permitindo o processamento de grandes números de amostras num período relativamente curto de tempo.

Os testes laboratoriais para marcadores fornecem resultados quantitativos com parâmetros objetivos.

Os ensaios laboratoriais para marcadores são relativamente baratos em comparação aos procedimentos radiológicos, histológicos e endoscópicos (muito usados nesses casos).

Apesar dessas vantagens, essas biomoléculas têm várias desvantagens como testes de triagem. Em particular, a falta de sensibilidade para a doença precoce invasiva ou lesões pré-malignas e a falta de especificidade para a malignidade limitam o uso dos marcadores existentes em indivíduos assintomáticos com malignidade precoce<sup>7,8</sup>.

## Marcadores Tumorais Séricos

Marcadores tumorais séricos são moléculas solúveis liberadas na corrente sanguínea por células cancerígenas ou outros tipos de células pertencentes ao microambiente tumoral<sup>13</sup>. O diagnóstico por medição dessas moléculas no sangue é considerado um método não-invasivo e econômico capaz de informar não somente a presença ou ausência de doença, mas também de sua evolução. O marcador tumoral sérico ideal detecta precocemente doença, prediz resposta ou resistência à terapia específica e monitora o paciente após a primeira terapia<sup>14</sup>. Essas informações, em conjunto, revelam a importância do uso desses marcadores na prática clínica.

No caso do câncer de mama, diferentes marcadores séricos foram testados para esses propósitos, com destaque, até o momento, para cinco marcadores mais usados clinicamente: Antígeno Carcinoembrionário (CEA), a forma solúvel da proteína MUC-1 (CA15-3), Antígeno Tissular Polipeptídico (TPA), Antígeno Tissular Polipeptídico Específico (TPS) e Receptor de Fator de Crescimento Epitelial humano 2 (s-HER2). Apesar de não serem usados rotineiramente em programas de rastreio<sup>13,14</sup>, há um debate intenso nas organizações científicas sobre seu uso diagnóstico e de recidiva de doença. Isso também se deve à introdução de novos mecanismos de exames de imagem com marcação molecular antes indetectáveis em mecanismos de imagem convencionais<sup>15</sup>.

A importância dessa revisão se embasa na necessidade constante, e relatada em diversos estudos, de mais análises prospectivas acerca do tema. É importante, pois, que se analise a literatura atual no que tange ao diagnóstico (principalmente o precoce) desse problema de saúde pública.

## IV. REVISÃO DA LITERATURA

### IV.1. O câncer de mama

O câncer (ou carcinoma) é um grupo de doenças que causa mudanças drásticas nas células do corpo, que crescem descontroladamente<sup>1</sup> e que tem subsistido há muitos anos, sendo atualmente um importante problema de saúde pública em todo o mundo. De acordo com ROBBINS et al. (2004, p.1180)<sup>2</sup>, o carcinoma é a malignidade mais comum da mama, e o câncer de mama é a malignidade não-cutânea mais comum nas mulheres. Ao longo dos últimos 50 anos, a incidência de câncer por todo o mundo aumentou significativamente: atualmente estima-se que uma mulher que viva até os 90 anos de idade tem uma chance em oito de desenvolver câncer de mama. Entre os diferentes tipos de câncer, o câncer de mama é um câncer heterogêneo e dependente de hormônios, representando cerca de 22,9% de todos os cânceres femininos<sup>17</sup>. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)<sup>3</sup>, é o câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano. O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas cerca de 1% do total de casos da doença. É bastante raro antes dos 35, sendo mais incidente após essa idade, especialmente depois dos 50 anos. Existem vários tipos de câncer de mama. Alguns evoluem de forma rápida e a maioria dos casos têm bom prognóstico. O INCA estima, para o ano de 2015, 57120 novos casos e 14388 mortes (aproximadamente 98,74% mulheres). Como a projeção demográfica continua a envelhecer, o número absoluto de pacientes com câncer de mama deverá aumentar em aproximadamente um terço nos próximos 20 anos, apenas devido ao efeito do envelhecimento da população. Poderia se esperar que até o ano de 2030 a taxa de incidência seria de 26,4 milhões e 17 milhões de mortes por câncer poderiam ocorrer em um ano<sup>16</sup>.

Os fatores de risco gerais do câncer de mama em mulheres são idade, infertilidade, idade da primeira gravidez de tempo integral, idade da menopausa, mutação herdada nos genes do câncer de mama BRCA1 e/ou BRCA2, uso de hormônios (estrogênio e/ou progesterona) na fase pós-menopausa. A maioria dos tipos de células cancerosas,



eventualmente, forma um nódulo ou massa chamado tumor, sendo nomeados por sua origem anatômica. O câncer da mama começa no tecido mamário, que é composto de glândulas para a produção de leite, chamados lóbulos, e os condutos que ligam os lóbulos ao mamilo. O restante da mama é composto de ácidos graxos, tecidos conjuntivo e linfático. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama são hormonais e genéticos (histórico familiar). Os carcinomas de mama podem, portanto, ser divididos em casos esporádicos, possivelmente relacionados à exposição hormonal, e casos hereditários associados a histórico familiar ou mutações da linha germinativa. O carcinoma hereditário recebe exame intensamente detalhado na expectativa de que as mutações genéticas específicas possam ser identificadas e de que essas alterações iluminem as causas de todos os cânceres de mama. Um histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau é relatado em 13% das mulheres com a doença<sup>4</sup>. Todavia, somente 1% das mulheres tem múltiplos parentes afetados, um histórico sugestivo de uma mutação altamente penetrante da linha germinativa<sup>4</sup>. Aproximadamente 25% dos cânceres familiares (ou em torno de 3% de todos os cânceres de mama) podem ser atribuídos a dois genes autossômico-dominantes altamente penetrantes: BRCA 1 e BRCA 2. A possibilidade de câncer associado a uma mutação nesses genes aumenta se houver parentes de primeiro grau afetados multiplamente, se os indivíduos forem afetados antes da menopausa e/ou tiverem cânceres múltiplos, se há um caso de câncer mamário masculino, ou se os membros da família também desenvolverem câncer ovariano. A duração geral do risco para o câncer de mama nas mulheres é de 60% a 85%, e a idade média no diagnóstico é de aproximadamente 20 anos mais cedo comparado às mulheres sem essas mutações.

Esta patologia é normalmente detectada, quer durante um exame de triagem, antes de os sintomas se desenvolverem, ou após os sintomas terem se desenvolvido, quando uma mulher sente um nódulo ao toque. A maioria das massas vistas em uma mamografia e a maioria dos nódulos mamários são benignos: sem crescimento descontrolado, sendo de mortalidade reduzida. A análise microscópica do tecido mamário é necessária para uma definição diagnóstica e da extensão da disseminação (*in situ* ou invasivo), além de caracterizar o padrão histológico da doença. Há basicamente as biópsias por agulha fina e excisão cirúrgica, sendo a seleção do tipo baseada em fatores clínicos do paciente, na disponibilidade de determinados dispositivos de biópsia e nos recursos locais.

#### **IV.1.1. Classificação morfológica do câncer de mama**

Existem atualmente algumas formas de classificar essa patologia e vários tipos de câncer de mama. Em alguns casos, um único tumor na mama pode ser uma combinação de vários tipos ou ser uma mistura de câncer de mama *in situ* e invasivo.

##### Carcinomas *in situ*

Correspondem à minoria dos cânceres de mama. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS), é um espectro de alterações de mama anormais que começam nas células que revestem os ductos mamários. CDIS é considerada uma forma não-invasiva de câncer de mama, porque as células anormais não têm crescimento além da camada de células de onde eles se originaram. É o tipo mais comum de câncer de mama *in situ*, representando cerca de 83% dos casos *in situ* diagnosticados entre 2006 e 2010 nos Estados Unidos<sup>1</sup>. O CDIS pode ou não evoluir para o câncer invasivo; na verdade, alguns desses tumores crescem tão lentamente que, mesmo sem tratamento, não afetariam à saúde da mulher. Estudos sugerem que cerca de um terço, e possivelmente mais, dos casos de CDIS vão progredir para câncer invasivo, se deixados sem tratamento<sup>5</sup>. Por isso, identificar os subtipos de carcinoma ductal *in situ* que são mais susceptíveis a se repetirem ou progredirem para câncer invasivo é uma área ativa de pesquisa. O carcinoma lobular *in situ* (CLIS, também conhecida como neoplasia lobular) não é um verdadeiro câncer ou pré-câncer, mas um indicador de risco aumentado para o desenvolvimento de câncer invasivo. O CLIS é muito menos comum do que CDIS, representando cerca de 12% dos cânceres de mama feminina *in situ* diagnosticados entre 2006 e 2010 nos Estados Unidos. Outros em cânceres de mama *in situ* têm características de ambos ductal e lobular ou têm origens desconhecidas<sup>5</sup>.

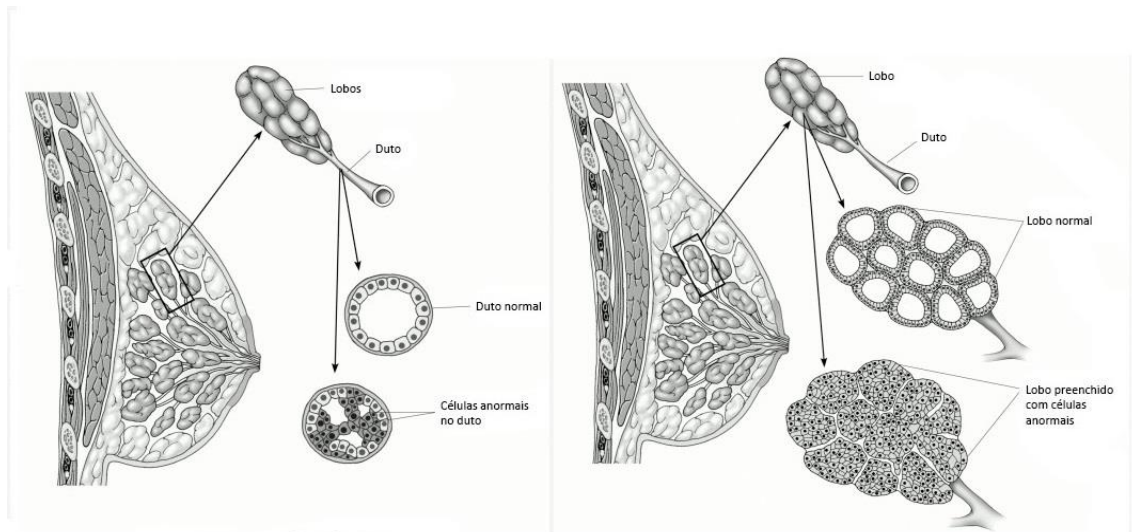
##### Carcinomas infiltrantes

A maioria dos cânceres de mama são invasivos, ou infiltrantes. Estes canceres ultrapassam os limites ductais ou glandulares, crescendo em torno do tecido mamário adjacente.

O prognóstico do câncer de mama invasivo é fortemente influenciado pelo estágio da doença: ou seja, a extensão ou propagação da doença no momento do primeiro diagnóstico. Há dois principais sistemas de estadiamento para o câncer. A classificação TNM dos tumores usa informações sobre o tamanho do tumor e até onde ele tem propagação no interior da mama (T), do grau de disseminação para os nódulos linfáticos (N), e da presença ou ausência de metástases distantes (disseminação para órgãos distantes) (M). Uma vez que as variáveis T, N e M são determinadas, um estágio de 0, I, II, III ou IV é atribuído, com 0 sendo carcinoma *in situ*, I sendo câncer invasivo em estágio inicial, e estágio IV sendo a doença mais avançada. O sistema de estadiamento TNM é de uso comum no cenário clínico.

O câncer da mama é cada vez mais considerado não uma única doença, mas um grupo de doenças que se distinguem por diferentes subtipos moleculares, fatores de risco, comportamentos clínicos, e respostas ao tratamento. Subtipos moleculares distintos de câncer da mama foram identificados utilizando perfis de expressão genética, que é um processo complexo e dispendioso. Aproximações mais convenientes de subtipos moleculares foram identificadas por meio de marcadores biológicos, incluindo a presença ou ausência de receptores de estrogênio (ER + / ER -), receptores de progesterona (PR + / PR -), e receptores do fator de crescimento epidérmico humano número 2 (HER 2 + / HER2 -). Atualmente, usando técnicas modernas de biologia molecular, surgiram novas classificações de tumores baseando-se nas suas características moleculares, possibilitando definir os chamados subtipos moleculares. Esta nova forma de classificar tumores ainda não é empregada rotineiramente, pois tem alto custo e exige técnicas custosas, como o perfil de expressão gênica, que ainda não está disponível para uso clínico (sendo cada vez mais usados para fins de pesquisa).

**IMAGEM I. Carcinomas Ductal e Lobular *in situ*** FONTE: adaptação de *American Cancer Society* (2013)<sup>(1)</sup>



### **Luminal A**

Cerca de 40% dos cânceres de mama são do tipo luminal A, tornando-o o subtipo mais comum de câncer de mama. Estes tumores tendem a ser ER + e / ou PR + e HER2-, de crescimento lento, e menos agressivos do que outros subtipos. Tumores tipo luminal A estão associados a um prognóstico mais favorável a curto prazo, em parte porque sua expressão de receptores hormonais é preditiva de uma resposta favorável à terapia hormonal, no entanto, a sobrevivência a longo prazo é semelhante ou até mesmo menor do que alguns outros subtipos.

### **Luminal B**

Cerca de 10% a 20% dos cânceres da mama são tumores do tipo luminal B. Como o luminal A, a maioria dos tumores do tipo luminal B são ER + e/ou PR +, mas distinguem-se seja pelas expressões de HER2 ou pelas altas taxas de proliferação (números elevados de células cancerosas em divisão ativa).

## **Basal-símile**

Cerca de 10% a 20% dos cânceres de mama são do tipo basal-símile, e que a maioria dos cânceres de mama deste tipo são referidos como "triplo negativo", porque eles são negativos para ER, PR, e HER2. Tumores basal-símile são mais comuns em mulheres afro-americanas, mulheres pré-menopáusicas, e naquelas com uma mutação no gene *Breast Cancer 1* (BRCA 1). Mulheres diagnosticadas com câncer de mama basal-símile têm um prognóstico a curto prazo mais negativo do que aquelas diagnosticados com outros tipos de câncer de mama, porque não há medidas terapêuticas específicas para esses tumores.

## **HER 2**

Cerca de 10% dos cânceres de mama produzem um excesso de HER 2 (uma proteína promotora de crescimento) e não expressam receptores hormonais (ER- e PR-). Semelhante ao subtipo basal-símile, esses cânceres tendem a crescer e se espalhar de forma mais agressiva do que outros cânceres de mama e estão associados a um pior prognóstico a curto prazo em comparação com os canceres de mama ER +. No entanto, o uso de terapias específicas para canceres HER2 + inverteu muito do impacto prognóstico negativo da alta expressão de HER2.

## V. METODOLOGIA

O estudo apresentado é uma revisão sistemática de literatura que analisa artigos originais sobre o uso diagnóstico de marcadores tumorais séricos como método diagnóstico do câncer de mama. Foram usadas as bases de dados eletrônicas PubMed, LILACS e SciELO; com as palavras-chave: *Breast Neoplasms, analysis, diagnosis, pathology, physiopathology, Tumor Markers/Biological, analysis e blood*. Essas palavras foram lançadas sozinhas nas bases e em combinação booleana.

Os critérios de inclusão usados na seleção de artigos foram, simultaneamente:

- estudos que avaliaram o uso de marcadores tumorais séricos no diagnóstico de câncer de mama; e
- estudos que incluíram pacientes com câncer de mama.

Artigos que não preenchessem esses critérios foram excluídos da análise.

Para a seleção dos artigos, os títulos e resumos foram avaliados por dois revisores independentes (pesquisador e orientador científico). Posteriormente, realizou-se uma intersecção dos resultados de cada um, com o intuito de oferecer rigor a este estudo. O produto final dessa revisão sistemática foi a análise descritiva dos dados coletados. Não foi utilizada Meta-análise.

## V.1. ELEGIBILIDADE DOS ESTUDOS

A pesquisa foi limitada a artigos originais publicados nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa, no período de 01 de janeiro de 2005 até 31 de dezembro de 2014 e a estudos em seres humanos, salvo estudos apontados como de referência na área. Os tipos de estudos considerados foram: estudos experimentais (ensaios clínicos randomizados) e estudos observacionais (casos-controles, cortes transversais e coortes) que discriminem a associação entre detecção do câncer da mama e marcadores tumorais séricos. Isto é, buscamos na literatura entender a que nível estamos atualmente no diagnóstico do câncer da mama em qualquer fase através de um marcador tumoral sérico.

## V.2. FONTES DE INFORMAÇÃO

As fontes de informação usadas serão as bases de dados do PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), LILACS (<http://lilacs.bvsalud.org/>) e SciELO (<http://www.scielo.org/php/index.php>), principalmente, além de trabalhos sugeridos pelo orientador.

## V.3. ESTRATÉGIA DE BUSCA

A busca utilizada foi baseada na estratégia PICO<sup>(18,19,20)</sup> contida no estudo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*). A sigla PICO representa um acrônimo para pacientes, intervenção, comparação e desfecho, sendo esses quatro componentes elementos fundamentais da questão de pesquisa e da construção de pergunta para a busca bibliográfica de evidências<sup>(18,21,22)</sup>. A pesquisa nos sites acima citados usando descritores específicos como: *Breast Neoplasms, analysis, diagnosis, pathology, physiopathology, Tumor Markers, Biological; analysis, blood* e os descritores booleanos utilizados buscaram as seguintes associações: *Breast Neoplasms/analysis OR Breast Neoplasms/diagnosis OR Breast Neoplasms/pathology OR Breast Neoplasms/physiopathology AND Tumor Markers, Biological/analysis OR Tumor Markers, Biological/blood*.

Inicialmente, foram avaliados os trabalhos que associavam câncer da mama e diagnóstico por marcador tumoral sérico da seguinte maneira:

1- Foram pesquisados, através dos descritores supracitados, trabalhos que citassem o tema de forma geral. Foram encontrados 7347 artigos no PubMed e 1121 artigos no SciELO.

2- Adicionaram-se os seguintes filtros: para estudos experimentais (ensaios clínicos randomizados e controlados) e observacionais (casos-controles, cortes transversais e coortes), com o texto integral disponível gratuitamente, publicados a partir do ano de 2005, nos idiomas português, espanhol e inglês e que utilizavam humanos. Restaram 168 artigos no PubMed e 13 artigos no SciELO.

3- Foi realizada leitura do título e do ABSTRACT como pré-seleção, para avaliar se a temática abordada no trabalho coincidia com o objetivo desta revisão. Restaram 4 artigos do PubMed que foram selecionados para leitura na íntegra e nenhum artigo do SciELO.

#### **V.4. PROCESSO DE SELEÇÃO DOS ESTUDOS**

Após a busca por artigos nos sites PubMed, LILACS e SciELO, encontrou-se um total de 4 artigos que preenchiam a todos os critérios estabelecidos. Com a adição de 1 artigo recomendado pelo orientador, totalizaram-se 5 artigos incluídos.

#### **V.5. PROCESSO DE COLETA DE DADOS**

Os dados foram obtidos a partir da leitura dos trabalhos selecionados. Nenhum autor foi contatado para confirmação dos dados.



## **V.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Os critérios de exclusão foram: artigos em quaisquer línguas que não o português, o espanhol ou o inglês; estudos não disponíveis gratuitamente; estudos anteriores ao ano 2005; estudos que não citavam o câncer da mama e estudos que envolviam animais.

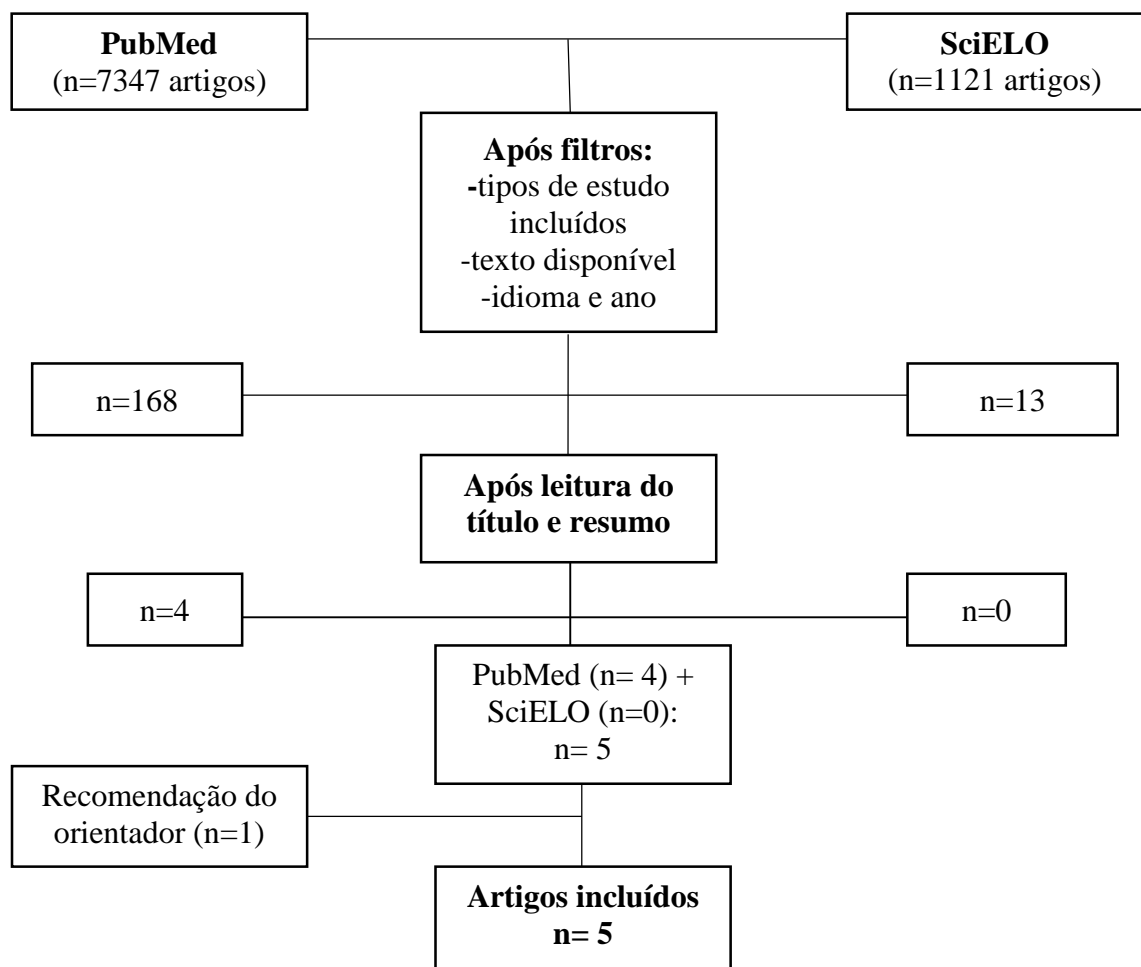
## **V.7. ASPECTOS ÉTICOS E DEONTOLÓGICOS**

Para este tipo de estudo não há necessidade de análise e parecer por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), segundo as regras estabelecidas na Resolução CNS-MS nº 466 de 12 de dezembro de 2012.

## VI. RESULTADOS

Foi encontrado um total de 4 artigos na literatura que atendem aos critérios de inclusão, e um indicado pelo orientador e considerado relevante, totalizando 5 artigos incluídos.

**Fluxograma 1. Processo de busca de dados**



Na base PubMed, optou-se por utilizar a combinação “*Breast Neoplasms AND Tumor Markers/Biological*”. A ferramenta “*Medical Subject Headings*” (MeSH) da base PubMed foi utilizada nessa busca. Seguem as definições dos termos selecionados de acordo com a ferramenta MeSH:

- **Breast Neoplasms**

*“Tumors or cancer of the human BREAST.”*

- **Tumor Markers/Biological**

*“Molecular products metabolized and secreted by neoplastic tissue and characterized biochemically in cells or body fluids. They are indicators of tumor stage and grade as well as useful for monitoring responses to treatment and predicting recurrence. Many chemical groups are represented including hormones, antigens, amino and nucleic acids, enzymes, polyamines, and specific cell membrane proteins and lipids.”*

A busca nas bases Scielo e Lilacs teve resultado semelhante ao da Pubmed, indicando a combinação booleana “*Breast Neoplasms AND Diagnosis*” como mais viável. Para essa combinação, as bases não geraram uma diferença de artigos, que não haviam sido gerados pela base PubMed. Dessa forma, as bases Scielo e Lilacs não contribuíram com essa revisão.

**Quadro 1.** Artigos incluídos na Revisão Sistemática

<b>TÍTULO DO ARTIGO</b>	<b>PRIMEIRO AUTOR E ANO</b>	<b>MOTIVO DA INCLUSÃO</b>
Thioredoxin 1 as a serum marker for breast cancer and its use in combination with CEA or CA15-3 for improving the sensitivity of breast cancer diagnoses.	Byung-Joon Park et al. 2014.	Preencheu os critérios.
Diagnostic and therapeutic strategy and the most efficient prognostic factors of breast malignant fibrous histiocytoma	Si-Qi Qiu et al. 2013.	Preencheu os critérios.
CA 15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group Trials	A Keshaviah et al. 2007.	Preencheu os critérios.
Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer.	Yu Sun et al. 2012.	Preencheu os critérios.
Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening.	Li-juan guo et al. 2012.	Indicado pelo orientador.

## VI.1. DESCRIÇÃO DOS ESTUDOS

**Park et al.** (2014), publicou um estudo de caso-controle, analisando amostras sanguíneas de 504 pacientes divididos em cinco grupos (quatro tipos de câncer e um grupo controle saudável), visando esclarecer se a medição dos níveis séricos de Tiorredoxina-1 (Trx1) serviria como um marcador sorológico para o carcinoma da mama. Foram medidos os níveis séricos de Trx1 em doentes com vários carcinomas (mama, pulmão, colorretal e câncer de rim), utilizando um ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), investigando suas associações com o estágio tumoral nas classificações de I a III. No ponto de corte 33,1725 ng/ml da Curva de Características de Operação do Receptor, a curva ROC (ROC), esses níveis séricos de Trx1 poderiam discriminar bem pacientes com doença de controles saudáveis, com uma sensibilidade de 89,8% e especificidade de 78%, e uma área sob a curva ROC (AUC) de  $0,901 \pm 0,0252$ . O nível sérico de Trx1 foi bem relacionado ao progresso do carcinoma da mama. Também foi investigada a capacidade de diagnóstico do CEA e do CA15-3 para a detecção precoce do câncer de mama metastático comparando com Trx1. Em contraste com os níveis séricos dos marcadores tumorais CEA e CA 15-3, os níveis séricos de Trx1 em pacientes com câncer precoce (grau I) foram significativamente superiores aos dos pacientes-controle saudáveis, o que mostra uma alta sensibilidade e a seletividade de diagnóstico (sensibilidade 89,4%, e 72,0 % de especificidade). A comparação aos cânceres pulmonar, colorretal e renal mostrou alguma relação entre níveis altos de Trx1 e risco dessas doenças, contudo, não analisaremos estes cânceres, tendo como foco principal o câncer de mama. A análise do uso combinado de CEA ou CA15-3 com Trx1 para a detecção do câncer de mama sugere que a capacidade diagnóstica do CEA ou CA15-3 sozinhos para a detecção precoce do câncer de mama, especialmente em relação a sensibilidade, é significativamente melhorada pela sua combinação com Trx1.

**Qiu et al.** (2013), publicou uma coorte prospectiva onde analisou 9 pacientes com histiocitoma fibroso maligno de mama entre 1994 e 2011 do Hospital do câncer afiliado da Faculdade de Medicina de Shantou. Todos pacientes femininos com idades entre 20 e 73 anos e idade média de 58 anos. Os padrões clínico-patológicos dos mesmos foram medidos por Imunohistoquímica, bem como análise biopsial dos tumores via coloração por Hematoxilina e Eosina. Foram acompanhadas por telefone e visitas clínicas regulares a cada 3-6 meses pelos 2 primeiros anos após diagnóstico, a cada 6 meses do terceiro ao quinto ano, e anualmente após tratamento primário cirúrgico.

Os pesquisadores identificaram e mediram os seguintes marcadores tumorais: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epitelial humano 2 (EGFR-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), p53, S-100, CD163, CD68 e Ki-67. Para o diagnóstico, foi usada marcação por imunohistoquímica, e especialmente a marcação do Ki-67 auxiliou nos achados de que esse marcador se relacionou a um pior prognóstico, sugerindo que a cirurgia segue como a primeira escolha de tratamento desse tipo de câncer de mama. Pode-se esperar que pacientes com envolvimento linfonodal axilar e alta expressão de Ki-67, desenvolvam recorrência precocemente, metástases distantes e pior prognóstico.

**Sun et al.** (2012), publicou um estudo de caso-controle onde realizou uma triagem dos níveis séricos de um marcador tumoral no Hospital do Câncer de Pequim de outubro 2010 a setembro de 2011. Analisou o soro de pacientes com diagnóstico histológico de câncer de mama (n=103), caracterizando o estágio TNM, receptores hormonais, a presença de s-HER2 e os subtipos. Pacientes com infecção severa, comorbidades clínicas ativas ou história de qualquer outra malignidade foram excluídos do estudo. Para 29 pacientes que receberam tratamento, uma segunda amostra foi coletada após 1 mês da ressecção tumoral e uma terceira amostra na avaliação periódica após 3 meses do início da quimioterapia. Todas as respostas à quimioterapia foram avaliadas de acordo com os protocolos da *World Health Organization* (WHO). Adicionalmente foram coletadas amostras sanguíneas de pacientes saudáveis do Hospital de Pequim (n= 55). Todos os pacientes envolvidos foram chineses étnicos e nenhum dos controles tinham diagnóstico prévio de malignidade. A idade média dos pacientes foi de 51 anos (36 a 78), sem nenhuma diferença estatisticamente significativa entre pacientes com câncer e controles saudáveis (p= 0,6999, teste de Mann-Whitney U).

Usou reação quantitativa da cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-qPCR), demonstrando significantes aumentos nos níveis do marcador tumoral micro-RNA 155 (miRNA-155) em pacientes com câncer de mama (n=103), quando comparados a controles saudáveis (n= 55) (p=0,001); com um valor médio de *fold change* de 2,94. A análise das Características de Operação do Receptor (ROC) revelou que o miRNA-155 teve uma acurácia diagnóstica relevante, rendendo uma área sob a curva ROC de 0,801 (sensibilidade de 65% e especificidade de 81,8%). Adicionalmente, o soro de uma parte de pacientes com câncer de mama (n=29) foi coletada após o tratamento cirúrgico e quatro ciclos de quimioterapia para avaliar os efeitos do tratamento clínico nos níveis séricos do miRNA-155. Um decréscimo no nível sérico de miRNA-155 foi encontrado enquanto concentrações dos marcadores CA15-3, CEA e antígeno polipeptídico específico de tecido (TPS) não mostraram essa tendência. Os resultados revelaram que 79% dos pacientes que mostraram resposta ou doença estável após a terapia tinham decréscimos nos níveis séricos de miRNA-155.

**Guo et al.** (2012), publicou um estudo de caso-controle analisando o uso diagnóstico de micro-RNA 181a (miRNA 181a) no Instituto Universitário Hospitalar do Câncer de Pequim, China. Para isso, comparou pacientes com câncer de mama e controles saudáveis, analisando seus níveis séricos de miRNA 181a e seu uso diagnóstico comparado ao dos marcadores tumorais CEA e CA15-3. Inicialmente foram quantificados os níveis séricos de miRNA 181a e miRNA 16 (como controle) em 20 amostras plasmáticas (10 controles e 10 pacientes). Os resultados promissores fomentaram a análise de 227 amostras adicionais. Os níveis de CA15-3 e CEA foram medidos usando ensaios de eletroquimioluminescência. Os níveis médios de miRNA 181a foram significativamente menores em pacientes comparados aos controles saudáveis (p=0,001). A análise estatística da área sob curva ROC demonstrou valores de sensibilidade e especificidade do miRNA 181a para o diagnóstico de câncer de mama de 70,7 e 59,9%, respectivamente, enquanto as sensibilidades do CA 15-3 e CEA foram de 10,53 e 9,21%. No caso de estágios iniciais de câncer de mama (carcinoma ductal *in situ* e câncer de mama TNM estágios I e II), o miRNA 181a também demonstrou maior valor de sensibilidade (55,28%) que CA 15-3 e CEA (8,13 e 7,32%, respectivamente). Não houve associação estatisticamente significativa (p>0,05) nesse estudo, entre nível sérico de miRNA 181a e outros parâmetros clínico-patológicos. Esses resultados sugerem que a

medida sérica de miRNA 181a pode ser usada como novo biomarcador para o diagnóstico de câncer de mama em estágio inicial bem como em câncer de mama primário.

**Keshaviah et al.** (2007), publicou um estudo de caso-controle onde fez uma análise combinada de sete ensaios clínicos internacionais referentes a grupos de estudos do câncer de mama. Avaliou a habilidade de dois marcadores tumorais séricos em prever novo diagnóstico de câncer de mama. Para isso, analisou as medidas de CA 15-3 e outro marcador, a fosfatase alcalina (ALP) de 3953 pacientes com uma ou mais medidas dessas moléculas durante seus períodos livres de doença. O marcador CA 15-3 foi considerado anormal quando superior a 30 U/mL ou maior que 50% que o primeiro valor registrado; ALP foi registrado como normal, anormal ou equívoco. Usou modelos de riscos proporcionais Cox com um indicador variável no tempo para CA 15-3 e/ou ALP. Em geral, o resultado foi aumento em 30% do risco de recorrência em pacientes com CA 15-3 anormais [Razão de risco (RR) = 1,30;  $p=0,0005$ ] e de 4% para ALP alterado (RR = 1,30;  $p=0,82$ ), enquanto foi ainda maior quando ambos alterados (RR = 4,69;  $p<0,0001$ ) ou nenhum alterado (RR = 2,40;  $p<0,0001$ ). O estudo, então, sugeriu o uso de CA 15-3 para diagnóstico recorrente superior ao do ALP, sendo sua acurácia aumentada quando em medição conjunta, questionando possível uso de rotina para aumentar sobrevida.

**Tabela 1.** Sistematização das informações dos artigos revisados.

<b>Autor/Ano</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Marcador</b>	<b>Estudo</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Duração</b>
Park <i>et al.</i> 2014	504	Tiorredoxina-1	Caso-controle	Confirma utilidade diagnóstica	Não se aplica
Qiu <i>et al.</i> 2013	9	Ki-67	Coorte prospectiva	Questiona utilidade diagnóstica	17 a 26 meses
Sun <i>et al.</i> 2012	155	miRNA-155	Caso-controle	Confirma utilidade diagnóstica	12 meses
Guo <i>et al.</i> 2012	227	miRNA-181a	Caso-controle	Confirma utilidade diagnóstica	Não se aplica
Keshaviah <i>et al.</i> 2007	3953	CA 15-3	Caso-controle	Confirma utilidade diagnóstica	Não se aplica



## VII. DISCUSSÃO

Nesse estudo, através de revisão sistemática de literatura, avaliou-se a importância diagnóstica do uso de marcadores tumorais séricos para o câncer de mama na literatura atual. Buscamos relacionar o uso de diferentes tipos moleculares que marcam e diferenciam a patogênese do câncer de mama, acometimento de prevalência mundialmente elevada. Assim como em outras patologias igualmente prevalentes, vemos a necessidade de apoio diagnóstico bem como de triagem e rastreamento que diferencie, com segurança e acurácia, pacientes saudáveis dos acometidos. No câncer de mama, assim como em outros tumores sólidos, os marcadores tumorais séricos disponíveis não são específicos para o tumor. Existem, no presente estudo, trabalhos considerando alguns marcadores tumorais mamários como o Ki-67, os tipos de micro-RNAs 155 e 181a. Entretanto, a maioria dos marcadores tumorais analisados demonstraram baixas sensibilidades e especificidades.

Houve, entre os estudos incluídos, uma heterogeneidade de resultados, correspondendo às diferenças de métodos analíticos usados, a diferença entre as populações analisadas e resultados divergentes. Uma limitação em geral no presente estudo foi o enfoque terapêutico e de acompanhamento do paciente previamente diagnosticado com câncer de mama, fato já consagrado na prática clínico-oncológica. Isto é, ainda nos encontramos incipientes no que tange ao uso puramente diagnóstico ou de triagem de marcadores tumorais séricos (e que se aproximem das características ideais dos marcadores). No caso do marcador Tiorredoxina-1 (Trx1), analisado por Park *et al.*, mostrou-se útil no diagnóstico do câncer de mama, exibindo níveis significativamente maiores que controles saudáveis. O estudo sugeriu essa conclusão após análise randomizada de testes laboratoriais (RT-qPCR e ELISA) entre outros tecidos com câncer, que mostraram níveis menores que os dos tecidos mamários com a patologia, conferindo uma acurácia elevada ao exame sorológico deste marcador.

Quando analisou-se o marcador Ki-67, notamos somente uma caracterização que fala a favor de um maior nível desta molécula com pior prognóstico. Contudo, este estudo analisou 9 pacientes, todas com prognóstico já bastante reservado devido à condição infiltrante do tumor e o foco do trabalho foi o uso deste marcador como sugestivo de recorrência da malignidade, porém, não foi conclusivo estatisticamente nesse achado, o

que não nos permite inferir sobre a referida molécula e o impacto de sua medição sérica no diagnóstico ou na sobrevida de pacientes.

No caso do marcador miRNA-155, houve achados significantes no seu uso diagnóstico, como diferenciador entre controles saudáveis e pacientes afetados. Os resultados do estudo de Sun *et al.* sugerem este ser um potencial biomarcador e que, pela primeira vez, foi encontrada uma relação entre queda dos níveis de miRNA-155 após cirurgia e quimioterapia, abrindo a possibilidade de seu uso terapêutico. Um fator limitante foi o uso de somente uma técnica laboratorial, sem uso de ELISA, o que reduz a sensibilidade do exame.

O marcador miRNA 181a, mostrou maior sensibilidade e especificidade para detecção precoce do câncer de mama que outras moléculas já consagradas pelo seu uso, como o CEA e o CA 15-3. Ou seja, revelou-se estatisticamente relevante quando em comparação a marcadores convencionais, tendo níveis menores em pacientes quando comparados a controles saudáveis.

No caso do marcador de fosfatase CA 15-3, este mostrou-se útil, como já se esperava pelo seu uso habitual em oncologia de grandes centros de referência, especialmente no diagnóstico de câncer de mama recorrente. O estudo de Keshaviah *et al.* explicita essa relação de anormalidade na medida dessa molécula no soro de pacientes e taxa de recorrência da doença.

Como já citado, a heterogeneidade das técnicas utilizadas nos estudos tornou-se um fator de confundimento desta revisão. Três estudos analisaram basicamente o uso diagnóstico dos marcadores tumorais (Park *et al.*, Sun *et al.* e Guo *et al.*), enquanto um (Qiu *et al.*) analisou uma caracterização diagnóstica de um tipo agressivo e bastante raro de tumor mamário (histioma fibroso maligno) e um último, o aumento no diagnóstico e possível sobrevida de pacientes em recorrência (novo diagnóstico) de malignidade. Ao mesmo tempo, outra limitação foi a do uso ou não em associação a outros marcadores já consagrados no acompanhamento terapêutico, tais como o CA 15-3 e CEA. Somente três (Guo *et al.*, Park *et al.* e Keshaviah *et al.*) destes o fizeram. Assim como as análises de outros marcadores descritos nesse estudo, houve discrepância entre achados de grupos étnicos, subtipos de câncer e variações individuais.

## VIII. CONCLUSÕES

- 1- Atualmente temos uma incidência aproximadamente constante de câncer de mama, bem como uma notável elevação da prevalência desse acometimento à medida que a pirâmide populacional tende ao envelhecimento. Isso dá importância especial à detecção precoce como uma medida promissora encontrada nesse estudo, sugerindo o uso de micro-RNAs no diagnóstico, seja no rastreio de grandes grupos populacionais ou na prática clínica cotidiana. Os resultados preliminares, portanto, falam à favor de associação positiva entre presença desse tipo de molécula e malignidade mamária em estágio inicial.
- 2- Para o uso clínico restam abertos questionamentos, que necessitam de estudos prospectivos melhor controlados e com mais estrito controle dos vieses envolvidos especialmente nos pacientes, que foram inicialmente de grupos étnicos caucasianos e asiáticos. Além disso, maiores e mais precisas conclusões se aliam à necessidade de pesquisas com maior número de indivíduos.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Câncer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. Atlanta; 2013 p. 1-25.
2. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7th ed. Elsevier; 2005.
3. Www2.inca.gov.br. INCA - CÂNCER - Tipo - Mama [Internet]. 2014 [cited 5 October 2014]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.
4. Ncbi.nlm.nih.gov. National Center for Biotechnology Information [Internet]. 2001 [cited 15 July 2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
5. Allred D. Ductal Carcinoma In Situ: Terminology, Classification, and Natural History. JNCI Monographs. 2010;2010(41):134-138.
6. Solin L, Gray R, Baehner F, Butler S, Hughes L, Yoshizawa C et al. A Multigene Expression Assay to Predict Local Recurrence Risk for Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2013;105(10):701-710.
7. Duffy M. Clinical Uses of Tumor Markers: A Critical Review. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2001;38(3):225-262.
8. Duffy M. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. European Journal of Internal Medicine. 2007;18(3):175-184.

9. Duffy M. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract.* 2013;22(1):4-11.
10. Almeida JRC. Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade. São Paulo: Atheneu; 2004:61-72.
11. Guimarães RC, Rodrigues VH, Pádua CAJ, Andrade FAF. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. *Prática Hospitalar (Belo Horizonte).* 2002; IV (23):1-8.
12. Duffy MJ: Use of biomarkers in screening for cancer. *EJIFCC* 2010;21, No1.
13. Tumor markers in breast cancer: evaluation of their clinical usefulness,. *Collegium Antropologicum.* 2011;35(1):241-247.
14. Bates S. Clinical Applications of Serum Tumor Markers. *Annals of Internal Medicine.* 1991;115(8):623.
15. Plebani M. Biochemical and imaging biomarkers: the search for the Holy Grail. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2010;48(8).
16. Boyle P, Levin B, editors. *World Cancer Report.* 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, International Agency for Research on Cancer; 2008.
17. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *GLOBOCAN 2008 v2.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide.* Lyon, France: IARC Cancer Base No. 10; 2010.
18. Akobeng AK. Principles of evidence based medicine. *Arch Dis Child* 2005 August;90(8):837-40.

19. Flemming K. Critical appraisal. 2. Searchable questions. *NT Learn Curve* 1999 April 7; 3(2):6-7.
20. Bernardo WM, Nobre MR, Jatene FB. Evidence-based clinical practice. Part II—Searching evidence databases. *Ver Assoc Med Bras* 2004 January-March; 50(1):104-8.
21. Antes G, Galandi D, Bouillon B. What is evidence-based medicine? *Langenbecks Arch Surg* 1999 October;384(5):409-16.
22. Nobre MR, Bernardo WM, Jatene FB. Evidence based clinical practice. Part 1—well structured clinical questions. *Rev Assoc Med Bras* 2003 October-December; 49(4):445-9.
23. Keshaviah A, Dellapasqua S, Rotmensz N, Lindtner J, Crivellari D, Collins J et al. CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. *Annals of Oncology* [Internet]. 2006 [cited 7 August 2014];18(4):701-708. Available from: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/18/4/701.long>