



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Análise molecular dos genes FHIT (Fragile Histidine Triad) e ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3 Related) em pacientes com câncer de mama

Rosiley Aparecida de Souza Rabelo

Uberaba-MG

2008

Rosiley Aparecida de Souza Rabelo

Análise molecular dos genes *FHIT* (Fragile Histidine Triad) e *ATR* (Ataxia-Telangiectasia and Rad3 Related) em pacientes com câncer de mama

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Clínica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg Antunes

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Uberaba – MG

Junho/2008

**Catálogo – na – fonte: Biblioteca da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**

R114e Rabelo, Rosiley Aparecida de Souza.

Análise molecular do gene *FHIT* e *ATR* em pacientes com
câncer de mama / Rosiley Aparecida de Souza Rabelo. - -
2008.

104 f. : tab. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia – Área de
concentração Patologia Clínica) – Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2008.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes.

1. Câncer de mama. 2. *FHIT*. 3. *ATR*. 4. Análise de
polimorfismos. I. Título. II. Antunes, Lusânia Maria Gregg.

NLM – WP870

*À minha mãe, que mesmo à distância continua sendo
meu porto seguro...*

*Ao meu noivo, Gabriel, pela sua enorme paciência,
SEMPRE me incentivando nos momentos de
fraqueza.*

*A Deus, pelas oportunidades colocadas em minha
vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luiz Pedrosa, muito mais que orientador... Obrigada pela dedicação, pela compreensão, pela paciência, pela amizade e, acima de tudo pelo grande exemplo de profissionalismo.

À Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg Antunes, minha gratidão pelo enorme incentivo e disposição em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pela sua grande colaboração, seu auxílio e estímulo.

À Prof^a. Dr^a. Carmem Lúcia Bassi, pela cooperação na elaboração deste projeto e por tudo que me ensinou o início do meu mestrado.

À Dra. Rosekeila Simões Nomelini e Dra. Marília, pela ajuda com as coletas das amostras, imprescindíveis na realização deste projeto.

À patologista Dra. Renata Margarida Etchebehere, pela dedicação e exemplo, indispensável na leitura das lâminas de imunohistoquímica.

Aos professores da disciplina de Parasitologia, Prof. Dr. Wendell Meira, Prof.^a Dr^a. Eliane Lages Silva, Prof.^a Dr^a. Márcia Benedita Oliveira Silva, sempre prestativos, e em especial ao Prof. Dr. Luis Eduardo Ramirez por ter cedido o laboratório de Parasitologia para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin, por ter disponibilizado o Laboratório de Biologia Molecular da disciplina de Imunologia.

A todos os funcionários do laboratório de Parasitologia e do laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, por toda a ajuda, sempre que precisei. À Dr^a. Marlene Cabrine dos Santos, em especial, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos pós-graduandos Jorge Marcelo, Tatiane, Gustavo, Henrique, Délio, Deisy, Glenda, Sandra, Elaine, Karine e Keila, pela convivência e amizade.

Ao Gabriel, pela ajuda nas análises dos meus dados e formatação da minha tese. Obrigada por estar presente em minha vida.

A todas as pacientes participantes desta pesquisa, que mesmo em um momento difícil de suas vidas, souberam o valor da pesquisa e não se negaram a ajudar.

À minha família, que mesmo longe sempre se fez presente. À minha mãe, pelo apoio e amor incondicional.

Ao apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU) e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Enfim, agradeço a todos que incentivaram ou contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigada!

Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e símbolos	x
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Câncer de mama	13
1.1.1. Etiologia	14
1.1.2. Fatores de risco	14
1.1.2.1. Histórico familiar	14
1.1.2.2. Fatores hormonais	15
1.1.2.3. Fatores ambientais	16
1.1.3. Marcadores tumorais no câncer de mama	16
1.1.3.1. Receptores hormonais	17
1.1.3.2. MIB-1	18
1.1.4. Genética do câncer de mama	19
1.2. O gene <i>FHIT</i> (Tríade Frágil da Histina)	21
1.2.1. Alteração do gene <i>FHIT</i> no câncer de mama	24
1.3. O gene <i>ATR</i> (Ataxia e Telangiectasia Rad-3 Relacionado)	26
1.4. Justificativa	29
HIPÓTESE e OBJETIVOS.....	30
2. HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1. Casuística	34
4.2. Extração e manipulação de ácidos nucléicos	35
4.2.1. Extração de DNA de leucócitos	35

4.2.2. Extração de DNA de tecido mamário	36
4.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4.3. Reação imunohistoquímica	39
4.4. Análise estatística	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Fatores de risco	46
5.2. Parâmetros tumorais	50
5.3. Análise de gene <i>FHIT</i>	53
5.3.1. Análise molecular	53
5.3.1.1 Perda de heterozigose (LOH) no gene <i>FHIT</i> x parâmetros tumorais	56
5.3.1.2 Perda de heterozigose (LOH) no gene <i>FHIT</i> x parâmetros clínicos	58
5.3.2. Análise da expressão da proteína Fhit	60
5.4. Análise do gene <i>ATR</i>	64
5.4.1. Análise molecular	64
5.4.1.1 Perda de heterozigose (LOH) no gene <i>ATR</i> x parâmetros tumorais	66
5.4.1.2 Perda heterozigose (LOH) no gene <i>ATR</i> x parâmetros clínicos	68
5.4.2. Alteração em <i>ATR</i> X alteração em <i>FHIT</i>	68
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	85
8. RESUMO	87
8.1. Abstract	89
9. REFERÊNCIAS	90
10. ANEXOS	101

Figura 1 - Loci do gene <i>FHIT</i> no 3p14.2	22
Figura 2 - Representação esquemática do gene, mRNA e proteína ATR	27
Figura 3 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a amplificação do gene da β -globina	38
Figura 4 - Distribuição das pacientes quanto à procedência	43
Figura 5 - Distribuição das pacientes quanto ao tipo histológico das alterações. A) grupo controle; B) grupo com carcinoma	45
Figura 6 - Cortes histológicos de tecido mamário evidenciando a expressão de marcadores tumorais pela coloração imunohistoquímica em diferentes intensidades	52
Figura 7 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i> pela amplificação do iniciador D3S1234	55
Figura 8 - Cortes histológicos de tecido mamário evidenciando a expressão da proteína Fhit pela coloração imunohistoquímica	63
Figura 9 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a perda de heterozigose no gene <i>ATR</i> pela amplificação do iniciador ATR1316	65

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores <i>FHIT</i> , <i>ATR</i> e β -Globina	37
Tabela 2 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama	49
Tabela 3 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) em relação às características tumorais	51
Tabela 4 - Análise da perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i> por diferentes marcadores	54
Tabela 5 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene <i>FHIT</i> e alterações mamárias	57
Tabela 6 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene <i>FHIT</i> e parâmetros	57
Tabela 7 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i> em relação aos marcadores tumorais	58
Tabela 8 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i> em relação às características clínicas e biológicas	59

Tabela 9 - Distribuição das pacientes (casos e controle) em relação às características clínicas e biológicas e perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i>	61
Tabela 10 - Correlação entre expressão da proteína e os grupos com carcinoma (caso) e grupo controle	62
Tabela 11 - Correlação entre expressão da proteína Fhit e a perda de heterozigose no gene <i>FHIT</i> nos grupos com carcinoma (caso) e grupo controle	62
Tabela 12 - Correlação entre expressão da proteína e os grupos com carcinoma (caso) e grupo controle com alterações em <i>FHIT</i>	62
Tabela 13 - Análise da perda de heterozigose no gene <i>ATR</i> por diferentes marcadores	64
Tabela 14 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene <i>ATR</i> e alterações mamárias	66
Tabela 15 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene <i>ATR</i> e parâmetros tumorais	67
Tabela 16 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene <i>ATR</i> em relação aos marcadores tumorais	67
Tabela 17 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene <i>ATR</i> em relação às características clínicas e biológicas	69

Tabela 18 - Distribuição das pacientes (casos e controle) em relação às características clínicas e biológicas e perda de heterozigose no gene <i>ATR</i>	70
Tabela 19 - Relação entre perda de heterozigose no gene <i>ATR</i> e alterações em <i>FHIT</i>	70
Tabela 20 - Análise de perda de heterozigose nos genes <i>FHIT</i> e <i>ATR</i> em regiões de diferentes marcadores	71
Tabela 21 - Resumo das reações imunohistoquímicas	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa	–	Aminoácidos
ADP	–	Adenosina difosfato
AMP	–	Adenosina monofosfato
Ap3A	–	Diadenosina-trifosfato hidrolase
Ap4A	–	Diadenosina-tetrafosfato hidrolase
ATM	–	Ataxia e Telangiectasia mutado
ATR	–	Ataxia e Telangiectasia Rad-3 Relacionado
BSA	–	Soro albumina bovino
BRCA1	–	<i>Breast cancer 1</i> gene
BRCA2	–	<i>Breast cancer 2</i> gene
cDNA	–	DNA complementar
CDI	–	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	–	Carcinoma ductal in situ
CEP	–	Comitê de Ética em Pesquisa
°C	–	Graus Celsius
DAB	–	3,3 Tetra-hidrocloreto Diaminobenidina
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	–	Desoxinucleotídeo tri fosfato
DSB	–	<i>Double-strand break</i> (quebra de fita dupla)
EDTA	–	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
FHIT	–	Tríade frágil da histidina
g	–	grama
× g	–	força centrífuga relativa
G ₀	–	Fase do ciclo celular
HE	–	Hematoxilina-eosina
HPV	–	Vírus do papiloma humano
HRT	–	Terapia de Reposição Hormonal
hUBC9	–	Ubiquitina 9 humana
IH	–	Imunohistoquímica
kb	–	quilo-bases
kDa	–	quilo-Daltons

Mb	–	Mega bases
mL	–	Mililitro
μL	–	Microlitro
mM	–	milimolar
ng	–	Nanograma
nM	–	Nanomolar
NA	–	Não amplificado
PBAAF	–	Punção Biópsia Aspirativa por Agulha Fina
PBS	–	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PIK-3	–	Fosfatidilinositol-3 quinase
LOH	–	<i>Loss of Heterozygosity</i> (perda de heterozigose)
LSAB	–	<i>Labeled streptavidin-biotin complex</i>
RE	–	Receptor de estrógeno
RH	–	Receptor hormonal
RP	–	Receptor de progesterona
SAM	–	Serviço de arquivamento médico
<i>Taq</i>	–	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polimerase
UFTM	–	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
v	–	Volume
V	–	Volts
χ^2	–	qui-quadrado

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo. Atualmente, mais de um milhão de mulheres no mundo são diagnosticadas com o câncer de mama por ano (TOMKA *et al.*, 2001). No Brasil, o número de casos novos de câncer de mama esperados para o ano de 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil mulheres (INCA, 2007).

Há maior freqüência de câncer de mama em mulheres do que em homens, numa proporção de 100 para 1. Nas mulheres a doença é mais freqüentemente diagnosticada entre 40 e 60 anos de idade sendo estimado que uma entre cada oito mulheres desenvolva o câncer de mama a partir dos 55 anos (EASTON, 2002).

Em alguns países desenvolvidos como os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega observa-se um aumento na incidência acompanhado de uma redução da mortalidade por essa doença, o que está associado à detecção precoce devido ao rastreamento pela mamografia e à oferta de tratamento adequado. Em outros países, como no caso do Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um retardamento no diagnóstico e na instituição de terapêutica adequada (BRASIL/INCA, 2004).

Devido à alta incidência e mortalidade do câncer de mama tornam indispensáveis os esforços no sentido de identificar elementos que possam aumentar a compreensão do comportamento biológico desta neoplasia e, por conseguinte, identificar pacientes com alto risco (INCA, 2007).

1.1.1. Etiologia

A etiologia do câncer de mama é desconhecida na grande maioria das pacientes, apesar de existirem fatores de risco que atualmente são associados à gênese da doença. Estes fatores não determinam, por si, a ocorrência do câncer, e sim um aumento no risco de desenvolver a doença, baseado em análises associativas.

Ao que tudo indica, o câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente. Acredita-se que 90%-95% deles sejam esporádicos (não-familiares) e decorram de mutações somáticas e que 5%-10% sejam hereditários (familiares) devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres suscetibilidade ao câncer de mama (BARROS *et al.*, 2001).

1.1.2. Fatores de risco

1.1.2.1. Histórico familiar

O histórico familiar é um importante fator de risco ao desenvolvimento de câncer de mama (NATHANSON *et al.*, 2001). O aumento do risco está

relacionado com a ocorrência do câncer de mama em parentes de primeiro grau (mães, irmãs e filhas), porém é insignificante quanto ao acréscimo de risco quando se trata de parentes de segundo grau afetado. O risco de uma mulher com histórico familiar de câncer de mama desenvolver essa doença pode variar de acordo com idade ou estado menopausal no momento do diagnóstico e em relação à lateralidade (uni ou bilateral) nos parentes afetados. O número de gerações afetadas também pode influenciar no risco de ocorrência (FRIENDERICH *et al.*, 2001).

1.1.2.2. Fatores hormonais

Menarca precoce (<12 anos), menopausa tardia (>55 anos), nuliparidade e idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos podem aumentar o risco da mulher em desenvolver o câncer de mama pelo efeito dos hormônios reprodutivos endógenos (HULKA & MOORMAN, 2001). A exposição prolongada ao estrógeno circulante contribui para o desenvolvimento da doença, possivelmente pela estimulação da proliferação celular, o que leva ao aumento da probabilidade de uma célula tumoral se multiplicar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2003).

Ainda existe muita controvérsia em relação ao uso de contraceptivos orais e sua associação com o câncer de mama. Aparentemente mulheres que usaram pílulas com dosagens elevadas de estrógenos ou por longo período de tempo, têm maior risco de desenvolver essa neoplasia, contudo, mulheres que interromperam o uso do contraceptivo a mais de dez anos possuem o mesmo risco de uma mulher que nunca utilizou a pílula (GRAM *et al.*, 2002).

Em relação à terapia de reposição hormonal (HRT), geralmente utilizada para o tratamento dos sintomas da menopausa, o uso recente de HRT combinada está associado ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama, sendo maior com o tratamento prolongado (COLDIZ *et al.*, 1993; SMIGAL *et al.*, 2006).

1.1.2.3. Fatores ambientais

A incidência de carcinoma mamário apresenta um padrão de variação internacional. No Japão, a incidência total de câncer de mama corresponde a 1/5 da incidência verificada nos Estados Unidos. Nesse país, a taxa permanece inalterada entre as imigrantes asiáticas, porém, entre as suas descendentes a incidência aumentou, igualando-se aos índices americanos (BUELL, 1973; HORTOBAGYI, 1995) sugerindo que o fator ambiental, ao invés do fator genético, é o principal responsável por essas diferenças internacionais observadas.

A obesidade, consumo de álcool e fumo estão associados ao aumento no risco câncer mama devido ao aumento nos níveis de estrógeno e andrógenos circulantes. Entre as mulheres obesas, o aumento no risco é observado após a menopausa devido aos altos níveis de estrógeno resultantes de uma maior conversão de andrógenos adrenais para estrógenos nos tecidos adiposos. Quanto ao consumo de álcool, a relação é dependente da dose e do tipo de álcool consumido (SMIGAL *et al.*, 2006; VOGEL *et al.*, 2000).

1.1.3. Marcadores tumorais no câncer de mama

Marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são moléculas presentes

no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor (ANDRIOLO, 1996).

A utilização do método imuno-histoquímico para a detecção de marcadores tumorais é bastante difundida, oferecendo algumas vantagens sobre o bioquímico uma vez que é possível trabalhar com material de arquivo e espécimes pequenos, além de ser o método mais econômico (MacGROGAN, 1996).

Os grandes avanços na Biologia Molecular, ocorridos nas últimas décadas, contribuíram bastante para o desenvolvimento de marcadores tumorais. A sua utilização na avaliação do prognóstico do câncer de mama está em crescimento uma vez que os fatores prognósticos convencionais identificam apenas as pacientes que têm um excelente ou um péssimo prognóstico. Para as remanescentes, os indicadores prognósticos atuais não são suficientemente sensíveis para determinar decisões terapêuticas. Assim, um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama seria a procura de marcadores que possam ajudar o clínico a identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos, para a instituição de terapia mais adequada (SHIMIZU *et al.*, 2000).

1.1.3.1. Receptores de estrógeno e progesterona

Os receptores hormonais (RH) são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares. Os mais estudados em carcinomas de mama são os receptores de estrogênio (RE) e os receptores de progesterona (RP).

Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é

regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia utilizando esse hormônio tem produzido remissão clínica em pacientes com este tipo de câncer. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis (FITZGIBBONS *et al.*, 2000).

O valor do estudo dos RE e dos RP na previsão da resposta ao tratamento hormonal do câncer de mama avançado tem forte embasamento: a taxa de resposta positiva é de 77% para os tumores positivos para ambos; 46% para os tumores negativos para RE e positivos para RP; 27% para os tumores positivos para RE e negativos para RP e, 11% para os tumores negativos para ambos. Os RE são também determinantes importantes na resposta à terapia hormonal em pacientes com doença recidivada uma vez que ocorrem variações da expressão dos RE entre o tumor primário e metástases em 25% dos casos (UMEMURA *et al.*, 2006).

1.1.3.2. MIB-1

Através da técnica de imunohistoquímica é possível avaliar a proliferação celular pela detecção e quantificação de proteínas celulares que somente existem durante essa fase. Vários antígenos têm sido identificados, entre eles o MIB-1 (para material parafinado), o Ki-67 (para material congelado) sendo que MIB-1 é um anticorpo direto contra partes do antígeno Ki-67. O MIB-1 e o Ki-67 são proteínas nucleares encontradas em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀ e sua utilização como fatores prognósticos no câncer de mama é bastante

difundida (JEZIORSKI *et al.*, 2000).

Tumores bem diferenciados tendem a ter baixo índice de proliferação, enquanto que os de alto grau tendem a ter alto índice de proliferação, apresentando um aumento na expressão tanto de MIB-1 ou Ki-67. Os tumores que apresentam altas taxas de proliferação celular, na grande maioria das vezes, são tumores de alto grau de malignidade e também são mais sensíveis ao tratamento, pois a maioria das drogas antineoplásicas é mais eficaz contra células mais rapidamente proliferativas (LEONG & LEE, 1995).

1.1.4. Genética do câncer de mama

O câncer de mama, como os cânceres em geral, é o resultado de alterações genéticas que podem tornar as células capazes de proliferar e migrar, escapando dos controles de morte celular programada (apoptose). Portanto, uma única célula neoplásica que tenha acumulado mutações germinativas e somáticas pode, através de um processo seqüencial de progressão tumoral, sofrer transformação maligna e metastatizar (DICKSON & LIPPMAN, 1995).

Há evidências recentes que a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer estaria relacionada a mutações e polimorfismos de alguns genes. Estudos sugerem que genes supressores tumorais e oncogenes envolvidos no reparo do DNA e na manutenção da integridade do genoma estão implicados na proteção contra as mutações que conduzem ao câncer (BOHR, 1995; JIRICNY *et al.*, 2000).

A predisposição genética à tumores é usualmente mediada pela herança da inativação de genes supressores tumorais. A inativação de um gene supressor

tumoral freqüentemente envolve a mutação em um alelo seguida pela perda ou troca de um segmento cromossômico que contém o outro alelo. Com o desenvolvimento de marcadores de microssatélites, que são repetições de di, tri ou tetra nucleotídeos *in tandem*, a perda alélica em tumores pode ser detectada com certa facilidade através de análises de perda de heterozigose (LOH, Loss of Heterozygosity) devido ao grande polimorfismo presente nestas regiões resultante da diferença no número de repetições (KAWAKI *et al.*, 2000).

Em famílias com alta incidência de câncer de mama, alterações nos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2 são frequentemente encontradas, sendo associadas ao processo de carcinogênese mamária. Esses genes parecem conferir uma estabilidade genômica através do seu envolvimento com os processos de recombinação, transcrição e reparo dos homólogos (MOTOYAMA *et al.*, 2004; KHANNA & JACKSON, 2001). FORD e colaboradores (1998) citam a contribuição de BRCA1 e BRCA2 para a herança do câncer de mama, através do estudo de ligação e análise de mutação em 237 famílias, estando 52% dos casos associados ao BRCA1, 32% ao BRCA2 e 16% relacionados a outros genes. Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, portanto, não são os únicos responsáveis pelo câncer de mama havendo assim ainda uma parcela desta doença a ser elucidada (CUI *et al.*, 2001).

Atualmente, estão sendo pesquisados polimorfismos em outros genes que podem estar relacionados a um aumento da susceptibilidade ao câncer de mama e seus possíveis usos como marcadores de prognóstico e preditivo e em câncer de mama.

1.2. Gene *FHIT* (Tríade da Frágil Histina)

Ao longo de todo o braço curto do cromossomo 3 (3p), alterações alélicas têm sido demonstradas nos cânceres de pulmão, rim, mama, entre outros (HUEBNER *et al.*, 1998). A região 3p14.2 contém vários sítios que contribuem para essas alterações, incluindo o locus do FRA3B, um dos sítios mais frágeis do genoma humano; um sítio de quebra da translocação t(3;8)(p14.2;q24) associada ao câncer renal familiar e um sítio de integração do papiloma vírus (GLOVER *et al.*, 1988). A presença desses sítios indicava que na região poderia estar localizado um gene importante para a iniciação e/ou progressão tumoral. Em 1996, estudos nessa região genômica resultaram na identificação do gene da tríade frágil da histidina (*FHIT*, *Fragile Histine Triad*), que seria alvo de alterações cromossômicas em 3p14.2. (OHTA *et al.*, 1996).

O gene *FHIT* é o segundo maior gene do genoma humano, contendo aproximadamente 1,8 megabases (Mb) (Figura 1). É composto por 10 éxons, dos quais cinco (éxons 5 ao 9) codificam um pequeno mRNA (1.1kb) que é traduzido na proteína Fhit com 16.8 kDa (OHTA *et al.*, 1996). A expressão da proteína é detectável nas células epiteliais na maioria dos tecidos humanos e de camundongos, localizando-se principalmente no citoplasma (DRUCK *et al.*, 1997; CHAUDHURI *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000).

Análises da sequência do cDNA de *FHIT* e de sua proteína revelaram que o gene é homólogo à família de genes caracterizados pela tríade da histidina, apresentando 69% de similaridade com a enzima do fungo *Schizosaccharomyces pombe* que possui atividade diadenosina-tetrafosfato hidrolase (Ap4A) (BARNES

et al.,1996; BRENNER *et al.*, 1997). Em estudos *in vitro*, Fhit se comporta como uma típica enzima diadenosina-trifosfato-hidrolase (Ap3A) e sua atividade enzimática é extinta por mutação em sua histidina central, contudo, sua função enzimática *in vivo* não foi demonstrada (BARNES *et al.*,1996). Em eucarióticos superiores, a função de ApnA está associada ao controle do crescimento celular e à replicação (SHI *et al.*, 2000), sendo que, Ap3A hidrolase reduz o nível intracelular de diadenosina trifostase por hidrólise tendo como produtos ADP e AMP (KISSILEV *et al.*,1998).

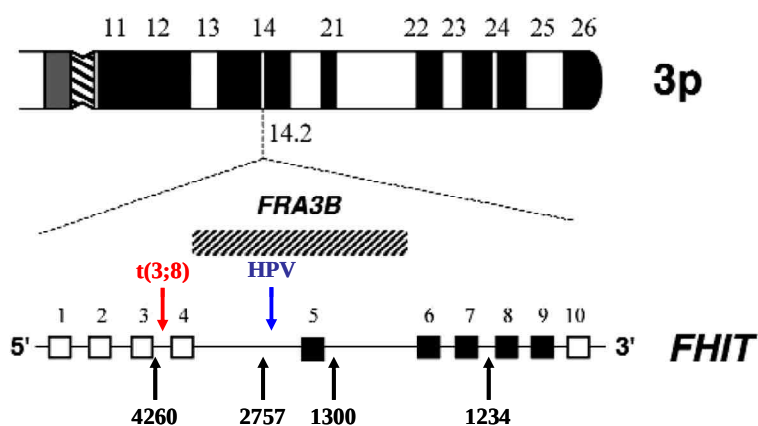


Figura 1 - Loci do gene *FHIT* no 3p14.2. Os éxons do gene são numerados de 1 a 10 sendo que a região codificante é corada em preto. As setas pretas mostram a localização dos marcadores de microssatélites D3S4260, D3S2757, D3S1300 e D3S1234. A seta vermelha mostra o ponto de quebra da translocação t(3;8)(p14.2;q24) associada ao câncer renal familiar. A seta azul mostra o sítio de integração do papiloma vírus. A barra tracejada representa a localização do sítio frágil FRA3B (Figura adaptada de PEKARSKY *et al.*, 2002).

O gene *FHIT* encontra-se alterado por deleções, raramente por mutações pontuais, em vários tipos de cânceres, principalmente em tumores epiteliais

expostos a carcinógenos como o câncer de pulmão, estômago e carcinoma cervical (CROCE *et al.*, 1999). Devido à freqüente inatividade gênica de FHIT na maioria dos tumores humanos e à presença do ponto de quebra da translocação associada ao carcinoma renal hereditário no locus do gene, muitos autores sugeriram que *FHIT* seria um gene supressor tumoral. Essa hipótese foi inicialmente muito discutida devido à simples presença do sítio frágil FRA3B poderia explicar as alterações encontradas no locus do gene. Entretanto, para demonstrar a atividade supressora de *FHIT*, SIPRASHVILI *et al.* (1997) transfectaram o cDNA de *FHIT* humano em quatro diferentes linhagens celulares com deleções homozigóticas do gene *FHIT*, injetaram as células transfectantes expressando Fhit em camundongos *nude*, nos quais a expressão da proteína Fhit diminuiu a tumorigênese.

A comprovação definitiva que *FHIT* atuaria como gene supressor tumoral foi demonstrada pela geração de camundongos *knockout*. Camundongos heterozigotos (*FHIT*+/-) e homozigotos (*FHIT* -/-) apresentaram maior incidência de tumores espontâneos e maior susceptibilidade a carcinógenos (FONG *et al.*, 2000; DUMON *et al.*, 2001). DUMON e colaboradores testaram, ainda em camundongos *knockout* (*FHIT*-/-), a expressão de *FHIT* mediada por adenovírus sendo que o desenvolvimento tumoral foi inibido pela administração de Fhit nesses camundongos.

O mecanismo molecular da função de *FHIT* como gene supressor tumoral ainda não é claro. Uma vez que camundongos *knockout* são viáveis e férteis, o gene FHIT não é essencial ao desenvolvimento embrionário (FONG *et al.*, 2000). Entretanto, *FHIT* mutante, sem a atividade Ap3A hidrolase, ainda atua como supressor tumoral, demonstrando assim, que a atividade hidrolítica não é

requerida para que *FHIT* possa suprimir a formação de tumores (PEKARSKY *et al.*, 2002).

SARD *et al.* (1999) sugeriram que *FHIT* está envolvido na apoptose e no controle do ciclo celular. Ainda em 1999, Chaudhuri *et al.* observaram a interação entre proteína Fhit e a proteína tubulina, sugerindo que *FHIT* possa exercer a atividade de gene supressor de tumor pela interação com os microtúbulos, e esta interação é independente da atividade enzimática Ap3A hidrolase. Em 2000, SHI *et al.* descreveram a interação física entre Fhit e a enzima conjugada de ubiquitina 9 humana (hUBC9). Como a enzima UBC9 em fungos está envolvida na regulação das fases M e S do ciclo celular, os autores sugeriram que Fhit desempenha um papel importante no controle do ciclo celular através desta interação.

1.2.1. Alteração do gene *FHIT* no câncer de mama

Aberrações cromossômicas, incluindo deleções homozigotas e a perda da heterozigose na região do gene *FHIT* foram observadas em vários tumores humanos, inclusive no carcinoma mamário (NEGRINI *et al.*, 1996). No câncer de mama esporádico (MAN *et al.*, 1996; AHMADIAN *et al.*, 1997; HUIPING *et al.*, 2000) e em lesões pré-neoplásicas (AHMADIAN *et al.*, 1997), a perda de heterozigose do gene *FHIT* tem sido observada em diferentes frequências, sugerindo que alterações nesse gene podem ser um evento precoce no desenvolvimento do câncer de mama.

A expressão da proteína Fhit foi avaliada, através de ensaios imunohistoquímicos, em carcinomas mamários invasivos e em lesões epiteliais,

que representam estágios da progressão do tumor. Os resultados mostraram que o epitélio lobular e ductal expressaram intensamente e constantemente a proteína Fhit. Porém, na maioria dos carcinomas foram observados a completa perda ou uma redução significativa na expressão dessa proteína (GATALICA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002).

No estudo de CAMPIGLIO *et al.* (1999), carcinomas primários de mama foram avaliados para verificar alterações na expressão gênica e protéica de FHIT em relação aos seus equivalentes epiteliais normais através das técnicas de PCR e imunohistoquímica, respectivamente. Apesar de terem sido observadas alterações na transcrição do gene em apenas 31% casos, a alteração ou ausência da proteína Fhit foi verificada em 69% dos tumores de mama. Essa alta frequência na alteração da expressão da proteína foi associada à maior proliferação celular e ao tamanho do tumor e está inversamente relacionada à progressão da doença (GATALICA *et al.*, 2000).

GINESTIER *et al.* (2003) procurando demonstrar a relação entre a expressão do gene *FHIT* e prognóstico das pacientes com carcinoma mamário, analisaram 2 grupos de pacientes: Grupo I, cujas pacientes possuíam um bom prognóstico e receberam apenas tratamento local com ou sem terapia hormonal; e Grupo II com pacientes de alto risco que receberam tratamento local e quimioterapia adjuvante. A expressão da proteína Fhit foi determinada por imunohistoquímica em três níveis: expressão positiva (como nas células epiteliais normais), intermediária e negativa. No grupo I, pacientes com câncer de mama que possuíam bom prognóstico, a expressão da proteína Fhit foi positiva ou intermediária, entretanto, no grupo II, cujas pacientes possuíam pior prognóstico, a expressão de Fhit estava ausente, mostrando assim a correlação entre a

expressão de Fhit e o prognóstico. Os autores sugerem que a proteína Fhit poderia ser um bom marcador tumoral, cuja expressão poderia separar as mulheres com câncer de mama em dois subgrupos (expressão ausente ou presente) com prognósticos diferentes. O grupo de pacientes com a expressão de Fhit negativa possuiria um tumor potencialmente mais agressivo e estaria na categoria de pacientes que necessitam de quimioterapia adjuvante.

A ausência de expressão da proteína Fhit em pacientes com carcinoma mamário está associada, segundo YANG *et al.* (2001), a uma sobrevida menor livre da doença, sugerindo que Fhit possui um papel crucial no desenvolvimento do câncer de mama.

1.3. O gene *ATR* (Ataxia e Telangiectasia Rad-3 Relacionado)

O processo de regulação do ciclo celular é efetuado, basicamente, pela ação de proteínas chave que controlam a sequência específica de eventos que caracterizam o ciclo. Estas proteínas formam uma rede intra e extracelular complexa, que coordena não apenas a proliferação celular, mas também a quiescência, a diferenciação e a morte celular. Essas proteínas são reguladas, por sua vez, através de processos como fosforilação, desfosforilação, síntese e degradação. Além disso, existem pontos de checagem, que funcionam como verdadeiros pontos de controle de qualidade, caso haja algum dano ao material genético, uma cascata de sinais é ativada para bloquear a progressão do ciclo celular naquela célula, colocando em funcionamento a maquinaria de reparo do material genético e/ou acionando a apoptose por meio de sensores, sinalizadores e efetores específicos. Alterações nesses pontos levam ao acúmulo de mutações

e aberrações cromossômicas, que aumentam a probabilidade de malformações e desenvolvimentos de doenças (BROWN & BALTIMORE, 2000).

Em síndromes de câncer familiar como Ataxia e Telangiectasia, Li Fraumeri, Anemia de Fanconi e câncer de mama hereditário, genes essenciais aparecem mutados e estão envolvidos na manutenção da integridade do genoma, participando no reparo aos danos no DNA e nos pontos de checagem (*checkpoints*) no ciclo celular (MOTOYAMA & NAKA, 2004).

Em mamíferos, duas importantes proteínas reguladoras do *checkpoint*, ATM (ataxia e telangiectasia mutado) e ATR (ataxia de telangiectasia Rad 3-relacionado), foram identificadas como membros da família fosfatidilinositol-3 quinase (PIK-3). Uma característica dessa família PKI-3 é seu grande tamanho, por volta de 300 a 500 kDa. A proteína ATR, cujo gene esta localizado no braço longo do cromossomo três (3q22-q24), contém 2644 aminoácidos e possui um domínio catalítico terminal (-300 aa) que é flanqueado por dois outros domínios conservados (YANG *et al.*, 2004).

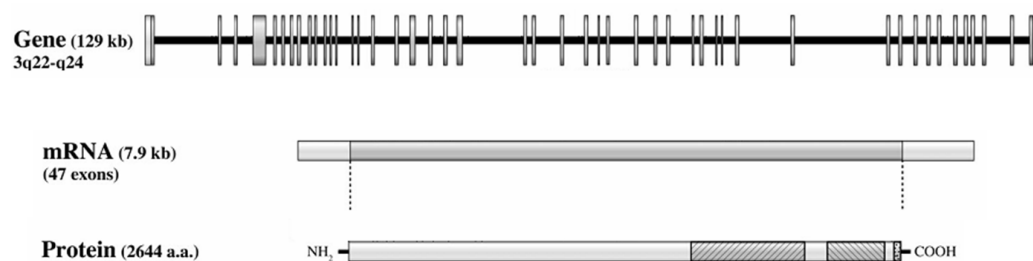


Figura 2 – Representação esquemática gene, mRNA e proteína ATR (Figura adaptada de DUROCHER *et al.*, 2006).

As quinases ATM e ATR atuam durante o *checkpoint* nas fases G1, S e G2 do ciclo celular como gatilhos de diversas respostas celulares aos danos no DNA ou erros na replicação (MOTOYAMA & NAKA, 2004). Essas são recrutadas para o sítio danificado, onde enviam sinais, através da fosforilação de resíduos de serina e treonina de proteínas alvo específicas e conectam-se a maquinaria CdK/ciclina, ativando o reparo do DNA (ABRAHAM *et al.*, 2001; BROWN & BALTIMORE, 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para a ativação de ATM e ATR pelos danos no DNA como a ativação direta através da interação com o DNA danificado; ativação indireta através da interação com proteínas de reparo e manutenção do DNA e ambas as ativações direta e indireta (YANG *et al.*, 2004). Estudos recentes sugerem que ATM e ATR desenvolvam funções sobrepostas na ativação do *checkpoint* em resposta a diferentes formas de dano ao DNA. ATM funciona como a primeira resposta a uma forma letal de dano ao DNA, a quebra de dupla fita (DSB - *Double-strand break*), enquanto que ATR atuaria na manutenção da fidelidade de replicação do DNA. Embora este mecanismo ainda não esteja muito claro, sugere-se que ATR monitore a progressão da forquilha de replicação e ative o *checkpoint* na ocorrência de alguma anormalidade estrutural ou DNA danificado, ou ainda, na exposição a agentes genotóxicos como hidroxiuréia e afilcolina, atrasando a replicação para que ocorra o reparo (CASPER *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2004). Na ausência de ATR, células acumulariam rapidamente anormalidades cromossômicas e perderiam a viabilidade na presença de agentes genotóxicos (BROWN, BALTIMORE, 2000).

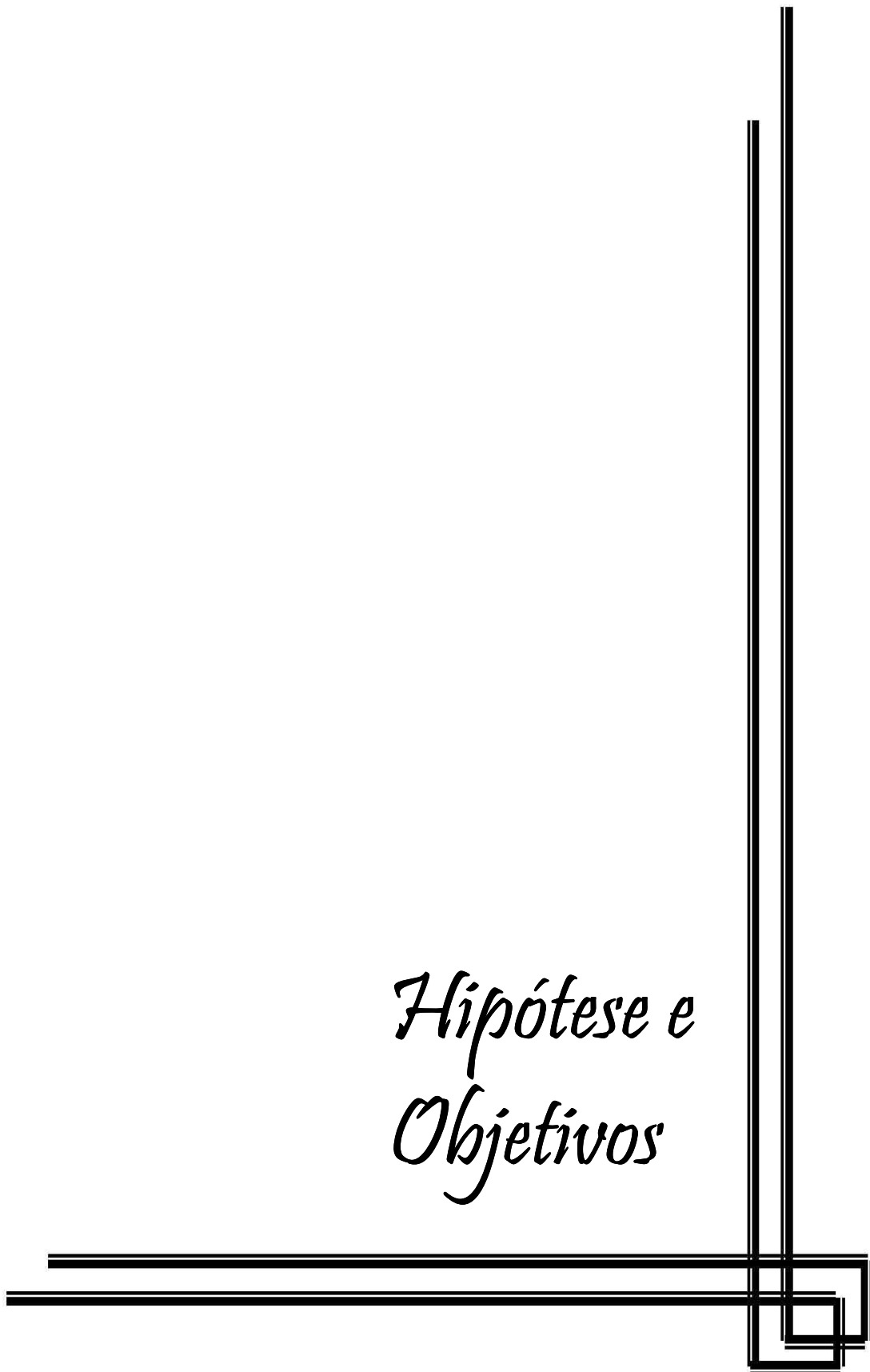
Recentemente, foi demonstrado que a quinase ATR exerce um papel crítico na manutenção da estabilidade dos sítios frágeis, sendo que a inativação

deste gene resulta na indução de sítios frágeis (CASPER *et al.*, 2002). Como o locus do gene *FHIT* localiza-se o sítio frágil FRA3B, alterações no gene *ATR* podem estar relacionadas com maior frequência de alterações no locus do gene *FHIT*.

1.4. Justificativa

Tendo em vista os dados da literatura, demonstrando a importância da inativação do gene *FHIT* para a progressão do câncer de mama em vários estudos e o fato de existirem poucas informações sobre o status desse gene em pacientes brasileiras, neste trabalho propomos a pesquisa de alterações moleculares no gene *FHIT* por técnicas de amplificação específica de segmentos de DNA (PCR - reação de polimerização em cadeia) e análise da expressão desse gene através da técnica de imunohistoquímica. Também propomos a avaliação do gene *ATR*, que é inédito em tumores de mama, estudando a associação com marcadores tumorais e a possível relação com alterações no gene *FHIT*. Esse estudo pode contribuir para a compreensão do papel desses genes no processo de tumorigênese como também sugerir novos alvos com valor no diagnóstico e prognóstico desse tipo de tumor.

Hipótese e Objetivos



2. HIPÓTESE

Os genes *FHIT* e *ATR* encontram-se inativados por perda de heterozigose em pacientes com câncer de mama e a expressão da proteína Fhit apresenta-se diminuída nos tecidos tumorais.

3. OBJETIVOS

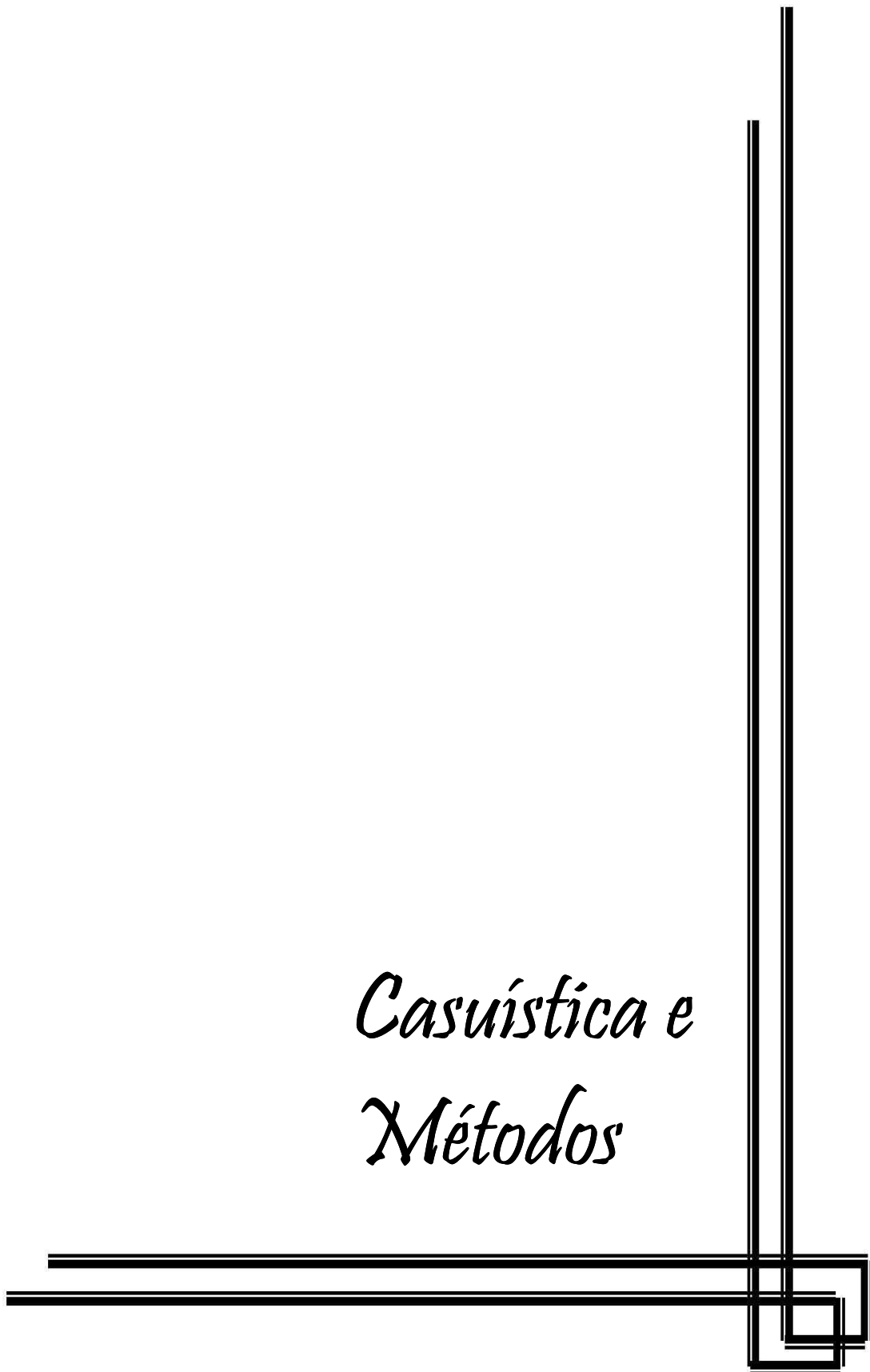
3.1. Objetivo geral

Avaliar alterações moleculares nos genes *FHIT* e *ATR* e verificar a expressão da proteína Fhit em tecidos mamários.

3.2. Objetivos específicos

- 1 - Determinar a ocorrência de perda da heterozigose (LOH) em diferentes regiões polimórficas dos genes *FHIT* e *ATR* em pacientes com câncer de mama e em pacientes com alterações mamárias benignas;
- 2 - Verificar a possível associação entre diferentes fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário e a presença de alterações nos genes *FHIT* e *ATR*;
- 3 - Pesquisar a possível associação entre a expressão de marcadores tumorais e a presença de alterações nos genes *FHIT* e *ATR*;
- 4 - Avaliar os níveis de expressão da proteína Fhit em tumores primários e alterações mamárias benignas;
- 5 - Verificar a relação entre a presença de alterações no gene *ATR* e alterações no gene *FHIT*.

*Casuística e
Métodos*



4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Avaliaram-se pacientes com diagnóstico de câncer de mama atendidas no Ambulatório de Mama da Universidade Federal do Triângulo Mineiro no período de junho de 2005 a fevereiro de 2007. Foram selecionadas as pacientes não submetidas a tratamento oncológico anterior ou que não estivessem em uso de drogas imunossupressoras, independente do estadiamento tumoral. O diagnóstico de câncer de mama foi realizado através de exame clínico e mamográfico e confirmado por Punção Biópsia Aspirativa por Agulha Fina (PBAAF), “Core Biopsy” e/ou cirurgia. Como grupo controle, foram selecionadas mulheres com alterações mamárias benignas que não estivessem submetidas a nenhum tipo de tratamento e ainda mulheres com hipertrofia mamária que passaram pela cirurgia de redução de mama.

As amostras de tecido mamário foram obtidas a partir de fragmentos encaminhados para o diagnóstico histopatológico, provenientes dos procedimentos de biópsia e/ou cirurgia. Estes fragmentos foram identificados e armazenados em freezer a -80°C até o momento da extração do DNA tecidual.

Também foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue periférico em tubos de vácuo contendo anticoagulante EDTA de todas as participantes da pesquisa. Esse material foi processado e congelado para a posterior extração de DNA dos leucócitos.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (CEP 591/2005). Os indivíduos selecionados passaram a participar do projeto

somente depois de obtida a concordância e a assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) onde os objetivos e procedimentos envolvidos no projeto foram explicados aos pacientes e aos seus familiares, quando presentes.

4.2. Extração e manipulação de ácidos nucléicos

4.2.1. Extração de DNA de leucócitos

A extração do DNA genômico das amostras sanguíneas foi realizada utilizando-se o protocolo de extração de DNA com fenol-clorofórmio descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) com adaptações. Resumidamente, cinco microlitros de sangue venoso foram colhidos e centrifugados a 200×g por 10 minutos. A camada intermediária, que continha os leucócitos, foi transferida para um tubo de polipropileno, onde, em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de lise de eritrócitos (sacarose 0,32M, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5mM, Triton X-100 0,75%). A solução foi então centrifugada a 15.000×g por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em água deionizada para a completa lise.

Após a lise dos eritrócitos, 200 µL de solução de lise de leucócitos (Tris-HCl 0,1mM pH=8,0, EDTA 0,5mM pH=8,0 , SDS 1%, NaCl 0,5 M) e proteinase K (concentração final 0,5 mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas em banho-maria a 37°C por 24h. Após a incubação acrescentou-se a mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), seguido de centrifugação a

15.000×g por 2 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi então precipitado pela adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M e 2 v etanol absoluto gelado. Após centrifugação a 15.000×g por 20 minutos, adicionou-se álcool 70% e feita centrifugação novamente nas mesmas condições. Ao final, o pellet seco foi ressuspensionado em água Mili-Q autoclavada e mantido em geladeira para a posterior quantificação e diluição em aproximadamente 3ng/μL.

4.2.2. Extração de DNA de tecido mamário

O tecido mamário foi mantido em freezer -80°C desde o momento da biópsia ou cirurgia até o processo de extração de DNA. Estes tecidos, ainda congelados, foram lavados com solução fisiológica para a retirada de sangue e transferidos para uma placa de Petri estéril. Em seguida, foram picotados utilizando-se lâmina de bisturi até a obtenção de minúsculos fragmentos, colocados em tubos autoclavados com o auxílio da lâmina, onde se adicionou NaOH (50mM). Estes tubos foram envoltos em papel alumínio e fervidos em banho-maria durante 10 minutos para que o tecido fosse lisado. Após a fervura, a suspensão foi neutralizada pela adição de Tris-HCl (130mM, pH=7,0), diluída 10 vezes em água e mantida a geladeira para posterior utilização (SANTOS, 2000).

4.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As análises de LOH foram realizadas por PCR utilizando-se marcadores de

microsatélites localizados dentro do gene ATR (D3S1316, D3S3710, D3S 3694) e marcadores que estão dentro do gene FHIT: D3S4260 (íntron 3), D3S2757 (íntron 4), D3S1300 (íntron 5), D3S1234 (íntron 8). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados de acordo com as informações depositadas no banco de dados hospedado no *site* www.ncbi.nlm.nih.gov. As seqüências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na tabela 1. Como controle da extração de DNA foi realizada a amplificação do gene da β -globina (figura 3).

As condições iniciais das reações de PCR foram realizadas como descrito por INGVARSSON *et al.* (1999) com posteriores adaptações. As reações foram preparadas para um volume final de 20 μ l contendo 10 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; e 75 mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 750 nM de cada par do iniciador e 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Cada microsatélite foi amplificado a partir de amostras de DNA genômico provenientes tanto de tecido tumoral quanto de tecido normal (sangue periférico).

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores FHIT, ATR e β -Globina.

Alvo	Marcador	Primer direto (5' — 3')	Primer reverso (5' — 3')
FHIT	D3S4260	CTGCAAAGAGGAAGGAAGGG	TGTGAAGTGTCAATCCATCCA
	D3S2757	TTATGGAAAAAGAGGTCACTGC	TCACCTGTGTTTGTTTGA
	D3S1300	AGCTCACATTCTAGTCAGCCT	GCCAATCCCCAGATG
	D3S1234	CCTGTGAGACAAAGCAAGAC	GACATTAGGCACAGGGCTAA
ATR	D3S3710	ACCTGACTCTATTGCCCT	GATTAAGTCCCACTCCCA
	D3S3694	AGTGTCCATCAACATGGG	TCGCACAAATAACAGGATTC
	D3S1316	TAGCCTGAAAATACACGCAT	GAGATCCAGAAGATTAACCGA
β -globina		GGTTGGCCA ATCTACTCCCAGG	GCTCACTCAGTG TGGCAAAG

Para a amplificação dos microssatélites, após uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, foram realizados de 30 a 35 ciclos das seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, associação a 48-58°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 a 45 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Alíquotas de 5 µl de produto de PCR foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra duas vezes concentrado, aplicadas em géis de poliacrilamida 7,5% e submetidas a eletroforese a 100V durante 3-4 horas. Para visualização das bandas utilizou-se o método de coloração de DNA por nitrato de prata 0,2% (p/v) (BASSAM *et al.*, 1991).

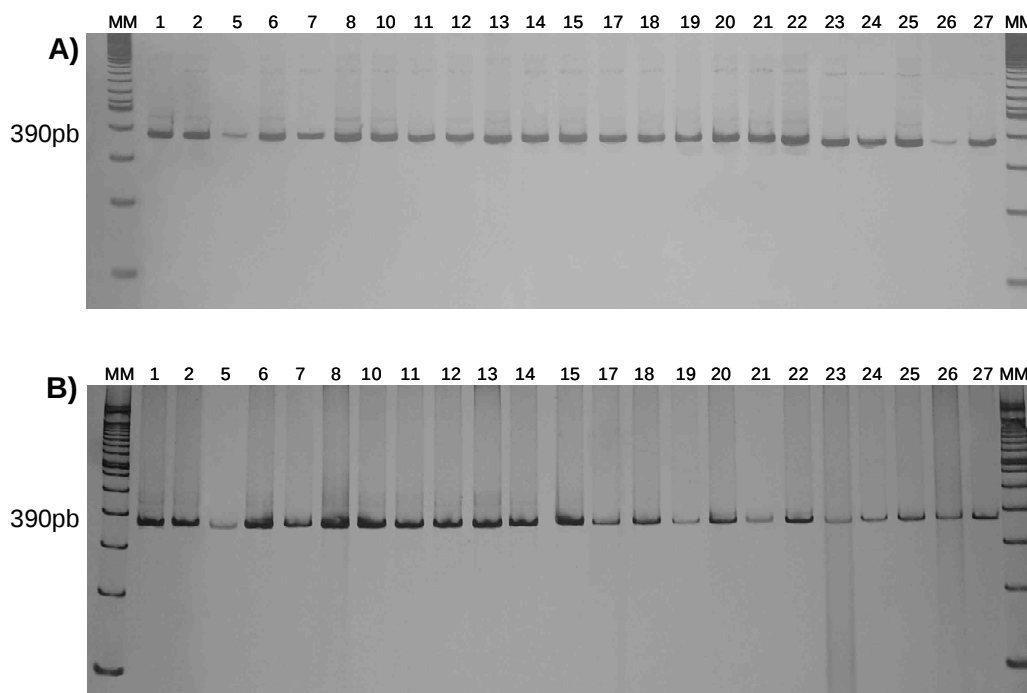


Figura 3 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a amplificação do gene da β -globina, utilizada como controle da extração. A) Amplificação DNA extraído do Sangue B) Amplificação DNA extraído do Tecido.

A análise da perda de heterozigose (LOH) foi realizada através da comparação da intensidade das bandas amplificadas correspondentes aos alelos dos microssatélites dos genes *FHIT* e *ATR* entre as amostras de DNA de tecido normal (tecido sangüíneo) e tumoral (tecido mamário) de cada paciente.

4.3. Reação Imunohistoquímica

O estudo imunohistoquímico foi realizado para a determinação da expressão protéica do gene *FHIT* utilizando-se o anticorpo primário policlonal de coelho anti-GST-Fhit (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA). Para isso, empregou-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase. Os casos foram identificados e realizaram-se novos cortes com 4 µm de espessura, em lâminas silanizadas (ATPS (Silano), Sigma® A3648). As lâminas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo cerca de 5 minutos em cada, e desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, cerca de 10 segundos em cada.

A seguir para a recuperação dos antígenos, as lâminas foram colocadas em tubos de citologia contendo solução tampão citrato 10mM (pH = 6,0) que foram vedados com papel alumínio e colocados dentro de uma panela à vapor (marca ARNO®), durante 40 minutos à 100°C.

Terminado o tempo os tubos foram resfriados e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando água oxigenada a 3% (v/v) 10 volumes, por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa as lâminas foram novamente lavadas em 3 banhos de tampão PBS e incubadas com o anticorpo primário por 1 hora à temperatura ambiente.

Os anticorpos foram diluídos em soro de albumina bovina (Sigma®) de acordo com as indicações presentes em suas especificações (diluição 1:100). Essas preparações de albumina bovina (BSA a 2%) e anticorpo primário permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir a coloração de fundo.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS e secas. O anticorpo secundário biotinilado (marca DAKO® LSAB+Peroxidase) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida foram realizadas lavagens em PBS, as lâminas foram secas como anteriormente e o complexo estreptoavidina peroxidase (marca DAKO LSAB+Peroxidase) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima. Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas, através da adição de uma solução cromógena, o Diaminobenzidine (DAB) (marca DAKO), por 5 minutos. Concluído o tempo as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas em hematoxilina de Harris, por 2 segundos. Finalmente as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada. As lamínulas com entellan foram adicionadas sobre as lâminas para análise posterior.

Como controle negativo foi utilizado o tampão PBS em substituição ao anticorpo primário. As amostras foram classificadas de acordo com a intensidade da marcação em: negativa (-), positivo fraco (+ ou ++) e positivo forte (+++ ou ++++).

Também foram realizadas reações de imunohistoquímica para marcadores tumorais já descritos no câncer de mama como MIB-1, receptor de estrógeno e receptor de progesterona.

4.4. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através do software STATISTICA® versão 7.0 e Microsoft EXCEL® 2003. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para análise de distribuição dos dados. Como todas as variáveis numéricas apresentaram distribuição normal, estas foram expressas em média. As variáveis categóricas foram comparadas por meio do teste do Qui-quadrado clássico e, quando necessário, o teste do Qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher.

Os resultados das análises de LOH nos genes *FHIT* e *ATR* foram expressos em frequências absolutas e relativas. Para a comparação entre o grupo controle e o grupo de pacientes com câncer de mama, bem como os resultados de expressão da proteína Fhit e os outros marcadores tumorais, também foram utilizados os testes do Qui-quadrado clássico e Yates. O nível de significância estatística para todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

Foram coletadas e analisadas amostras de 42 mulheres com alterações mamárias (casos e controles), dentre as quais 29 (69,0%) eram provenientes da cidade de Uberaba, três (7,2%) pacientes de Ibiá, duas (4,8%) de Campos Altos, duas (4,8%) de Perdizes, uma (2,4%) de Delta, uma (2,4%) de Monte Carmelo, uma (2,4%) de Pratinha e uma (2,4%) de São Gotardo. Duas pacientes eram procedentes de outros estados, sendo uma (3,7%) da cidade de Jales, em São Paulo e outra (3,7%) da cidade de Itumbiara, situada no interior de Goiás (figura 4).

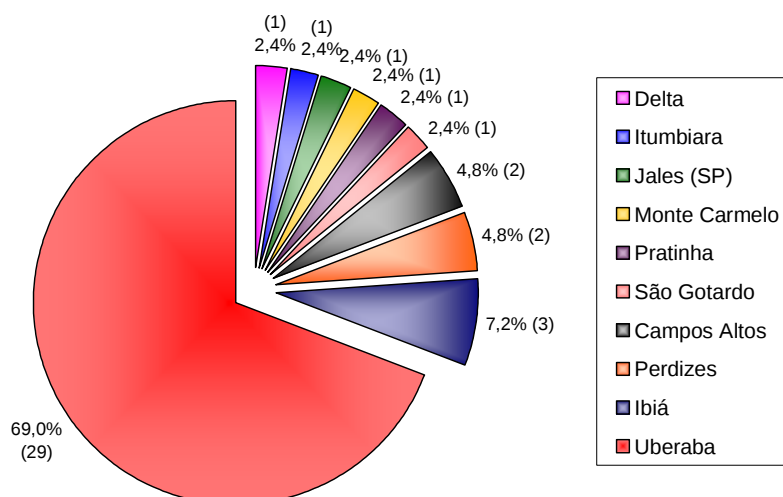


Figura 4 - Distribuição das pacientes quanto à procedência.

Para a formação do grupo controle, foram selecionadas 16 mulheres com alterações mamárias benignas. O fibroadenoma foi a alteração mais freqüente, diagnosticado em oito mulheres (50%), seguido pela hiperplasia epitelial (3

pacientes, 18,8%) e hipertrofia mamária (2 mulheres, 12,5%). Ainda, foram selecionados um caso de lipoma, um de mastite granulomatosa e um caso metaplasia mióide, representando 6,3% cada (figura 5A).

O grupo de estudo foi formado por 26 pacientes com alterações malignas. Todas as pacientes apresentaram carcinoma ductal, sendo 25 pacientes (96,2%) com carcinoma invasivo (CDI) e uma paciente (3,8%) com carcinoma *in situ* (CDIS) (figura 5B). Entre os carcinomas invasivos, seis (23,1%) foram classificados em grau I, oito (30,8%) em grau II e três (11,5 %) em carcinoma ductal invasivo grau III. Ainda dentro do grupo com carcinoma ductal invasivo, 14,8% apresentaram o subtipo mucinoso, sendo três (11,5%) classificados como grau I e um (3,8%), como grau II. Outro subtipo encontrado foi o carcinoma apócrino, diagnosticado em três (11,5%) pacientes, os quais foram classificados como carcinoma ductal apócrino invasivo de grau II. Entre os carcinomas mistos, foi encontrada a doença de Paget associada a um carcinoma ductal invasivo grau II em uma paciente (3,8%).

Entre as pacientes aqui estudadas (casos e controles) apenas uma paciente com carcinoma ductal invasivo grau II foi a óbito (tabela 2).

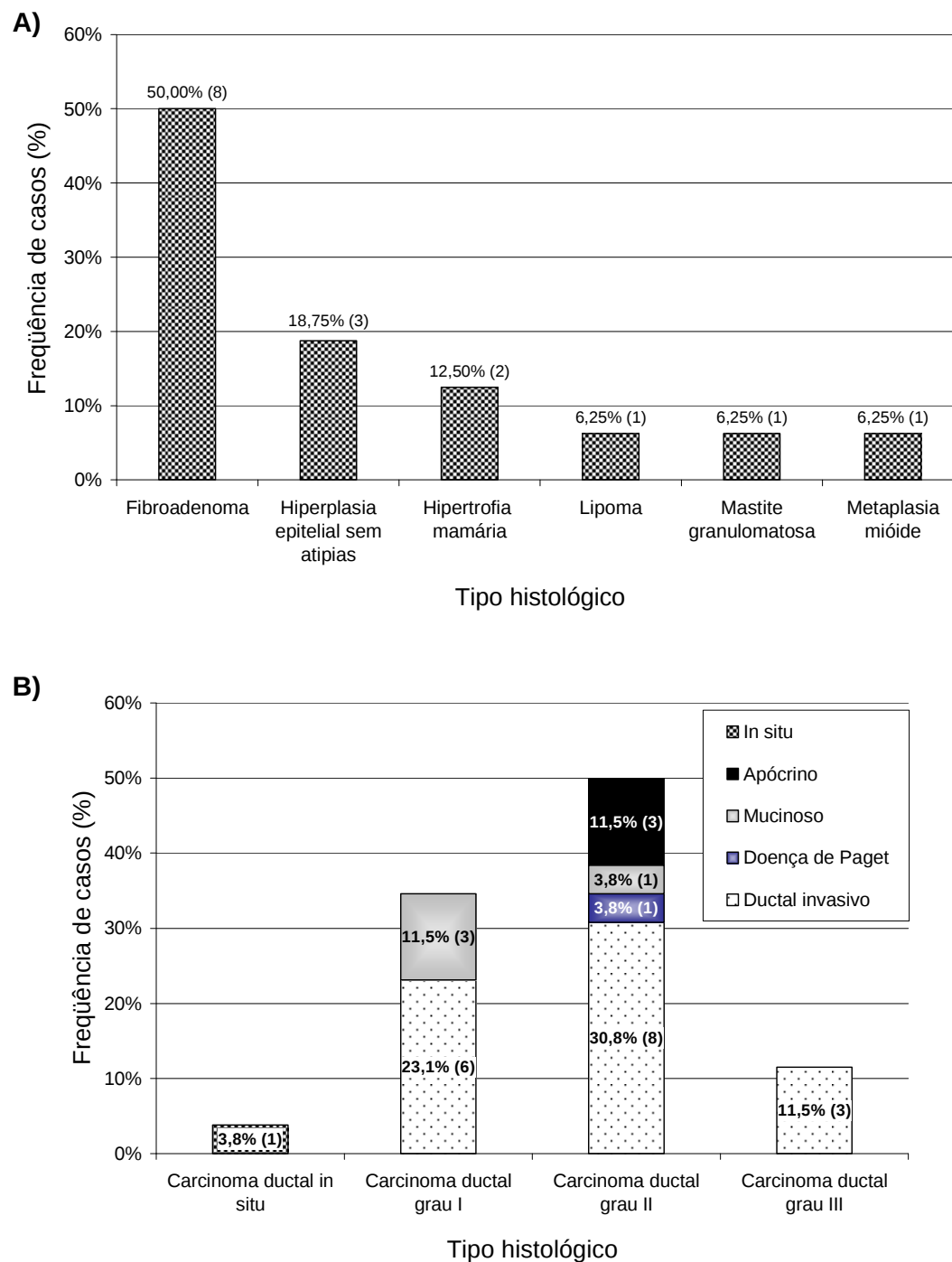


Figura 5 - Distribuição das pacientes quanto ao tipo histológico das alterações. **A)** grupo controle; **B)** grupo com carcinoma.

5.1. Fatores de risco

A média de idade entre os casos de carcinoma foi de 55,5 anos, variando entre 39 e 79 anos. A média de idade no grupo controle foi de 40,1 anos, variando entre 22 e 72 anos. Houve diferença significativa ($p=0,0003$) entre a faixa etária desses dois grupos, ou seja, a maioria (69,3%, $n=18$) das mulheres com carcinoma mamário apresentou idade igual ou superior a 50 anos, enquanto que a maioria das mulheres do grupo controle (87,5%, $n=14$) possuía idade inferior a 50 anos (tabela 2).

Quanto à etnia das pacientes, no grupo com alterações malignas a maioria (76,9%, $n=20$) foi declarada como branca, contrapondo-se ao grupo controle, no qual a maior parte (56,3%, $n=9$) foi considerada como não branca ($p=0,0293$) (tabela 2).

Não houve diferença entre o grupo com carcinoma e o grupo controle quanto à presença de familiares com câncer de mama. No primeiro grupo, 17 (65,4%) pacientes relataram não possuir parente com este tipo de câncer. Entre as nove pacientes (34,6%) com histórico familiar da doença, duas (7,8%) declararam ter parente de 1º grau (mãe ou irmã) e sete pacientes (26,8%), primas ou tias de primeiro grau com câncer de mama. Da mesma forma, no grupo de mulheres com alterações benignas, a grande maioria (92,9%, $n=13$) disse não ter casos de câncer de mama na família, sendo que apenas uma paciente (7,1%) declarou ter uma irmã com a doença. Duas pacientes do grupo de estudo e duas do grupo controle não souberam responder.

Os antecedentes ginecológicos foram informados ao médico durante as consultas e obtidos por meio dos prontuários dessas pacientes (tabela 2). A média de idade de menarca foi de 13,0 anos (variando dos 10 aos 16 anos) e 12,7 anos (variando dos 10 aos 17 anos) no grupo com carcinoma e controle respectivamente. No primeiro grupo, a menarca ocorreu precocemente, antes dos 12 anos de idade, em 10 (41,7%); na faixa considerada normal, entre 12 e 16 anos, em 11 (45,8%) pacientes e três pacientes (12,5%) apresentaram menarca tardia, acima dos 16 anos. Já no grupo controle, oito pacientes (50,0%) apresentaram menarca precoce, seis (37,5%) entre os 12 e 16 anos e duas (12,5%) menarca tardia.

Houve diferença significativa ($p=0,007$) quanto ao estado de menopausa entre os dois grupos estudados (tabela 2). Enquanto que no grupo de pacientes com câncer de mama a maioria das mulheres (66,7%, $n=16$) já haviam passado pelo período de menopausa, no grupo controle a maioria das mulheres (87,5%, $n=14$) ainda estavam na menacme (período fértil). Entre aquelas com carcinoma no período pós-menopausa, a média de idade para o término da menstruação foi de 48,6 anos, variando entre 38 e 57 no grupo de mulheres com câncer. Duas (12,4%) pacientes apresentaram menopausa precoce, antes dos 40 anos, e nove pacientes (56,3%), entre os 40 e 50. A menopausa acima dos 50 anos, considerada tardia, foi observada apenas no grupo de mulheres com câncer, ocorrendo em cinco pacientes (31,3%). No grupo controle apenas duas mulheres (12,5%) estavam na pós-menopausa que ocorreu na faixa etária considerada normal (entre 40 e 50 anos).

A média de idade da primeira gestação a termo foi de 23,8 e 23,2 anos

entre as mulheres com câncer e as mulheres com alterações benignas, respectivamente, variando entre 17 e 40 anos no primeiro grupo e entre 15 e 39 anos no segundo grupo (tabela 2). Em ambos os grupos, 75% das pacientes tiveram o primeiro filho anterior aos 30 anos. No grupo com carcinoma, quatro mulheres (16,7%) tiveram a primeira gestação a termo acima dos 30 anos e, ainda, duas pacientes (8,3%) eram nulíparas. Dados semelhantes foram encontrados no grupo controle, no qual a primeira gestação a termo ocorreu após os 30 anos em duas pacientes (12,5%) e outras duas (12,5%) pacientes nunca tiveram filhos.

Quanto ao uso de pílulas anticoncepcionais, em ambos os grupos a maioria das pacientes informaram que nunca utilizaram esse método. Entre as mulheres com carcinoma, 10 pacientes (41,7%) tomaram pílula, enquanto que no grupo controle apenas duas pacientes (12,5%) declararam o mesmo (tabela 2).

Em relação aos hábitos das pacientes, foi analisado o uso de tabaco e bebida. O grupo de pacientes com câncer de mama apresentou maior taxa de fumantes (45,8%, n=11) quando comparado ao grupo controle (18,7%, n=3), contudo, essa diferença não foi significativa ($p=0,078$). Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, a maioria das pacientes dos dois grupos declararam não ser etilistas (91,7% do grupo com câncer e 93,7% do grupo controle) (tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) em relação às características clínicas

	Casos (26)			Controles (16)			Valor-p
	média	n	%	média	n	%	
Idade	55,5			40,1			
< 50		8	30,7%		14	87,5%	0,0003
≥ 50		18	69,3%		2	12,5%	
Etnia	NA			NA			
caucasianas		20	76,9%		7	43,8%	0,0293
negróides		6	23,1%		9	56,3%	
Óbito	NA			NA			
sim		1	3,8%		0	0,0%	0,6190
não		25	96,2%		16	100,0%	
História familiar de câncer de mama				NA			
sim		9	34,6%		1	7,1%	0,1257
não		17	65,4%		13	92,9%	
não informado		2			2		
Menarca	13,0			12,7			
precocce (≤ 12 anos)		10	41,7%		8	50,0%	0,8585
normal (13-15 anos)		11	45,8%		6	37,5%	
tardia (≥ 16 anos)		3	12,5%		2	12,5%	
não informado		2			0		
Menopausa	48,6			47,0			
sim		16	66,7%		2	12,5%	0,0074
não		8	33,3%		14	87,5%	
não informado		2			0		
precocce (< 40 anos)		2	12,4%		0	0,0%	0,3434
normal (40-50 anos)		9	56,3%		2	100,0%	
tardia (> 50 anos)		5	31,3%		0	0,0%	
1ª gestação	23,8			23,2			
< 30 anos		18	75,0%		12	75,0%	0,8702
≥ 30 anos		4	16,7%		2	12,5%	
nulípara		2	8,3%		2	12,5%	
não informado		2					
Anticoncepcional	NA			NA			
sim		10	41,7%		2	12,5%	0,1052
não		14	58,3%		14	87,5%	
não informado		2					
Fumo	NA			NA			
sim		11	45,8%		3	18,7%	0,0785
não		13	54,2%		13	81,3%	
não informado		2			0		
Bebida	NA			NA			
sim		2	8,3%		1	6,3%	0,7131
não		22	91,7%		15	93,7%	
não informado		2			0		

NA= não aplicável

5.2. Parâmetros tumorais

Quanto às características do tumor, foram analisados o tamanho tumoral e o grau de comprometimento dos linfonodos axilares. Quatro pacientes (23,5%) apresentaram tumores com diâmetro superior a 2 cm e 13 pacientes (76,5%) e inferior com tamanhos inferiores a 2 cm. Em oito pacientes o tamanho não pode ser determinado. O comprometimento axilar foi avaliado em 22 (84,6%) pacientes, sendo que apenas duas pacientes (9,1%) apresentaram linfonodos reativos, nos quais o comprometimento foi superior a três linfonodos (tabela 3).

Para a realização da reação imunohistoquímica (IH) estavam disponíveis blocos de 25 pacientes do grupo com câncer de mama e de 13 pacientes do grupo controle (tabela 3).

A expressão do receptor de estrógeno nos tecidos analisados foi classificada como positivo forte em 14 (56%) carcinomas mamários e em oito (61,5%) alterações encontradas no grupo controle. Ainda comparando os grupos, em seis carcinomas (24%) a expressão do RE foi negativa, enquanto no grupo controle houve expressão de RE em todos os casos estudados, apesar dessa diferença não ter sido significativa ($p=0,118$).

Em relação ao receptor de progesterona (RP), houve uma diferença de expressão significativa entre os grupos ($p=0,038$). Enquanto no grupo de estudo a maioria dos carcinomas não expressaram (32%, $n=8$) ou expressaram fracamente RP (60%, $n=15$), as alterações do grupo controle expressaram RP numa intensidade fraca (53,8%, $n=5$) ou forte (38,5%, $n=8$).

Também houve diferença de expressão de Mib-1 entre os grupos ($p=0,042$). Entre os carcinomas, grande parte (76,0%, $n=19$) expressou a proteína Mib-1 fracamente, enquanto que o grupo controle a maioria (58,4%, $n=7$) não expressou essa proteína (tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) em relação às características tumorais.

	Casos (25)		Controles (13)		Valor-p
	n	%	n	%	
Tamanho tumoral					-
< 1 cm	13	76,5%	-	-	
> 2 cm	4	23,5%	-	-	
não informado	8	-	-	-	
Comprometimento de linfonodos axilares					-
0	20	90,9%	-	-	
≥ 3	2	9,1%	-	-	
não informado	3	-	-	-	
Receptor de estrógeno					0,1180
negativo	6	24,0%	0	0,0%	
positivo fraco	5	20,0%	5	38,5%	
positivo forte	14	56,0%	8	61,5%	
Receptor de progesterona					0,0388
negativo	8	32,0%	1	7,7%	
positivo fraco	15	60,0%	7	53,8%	
positivo forte	2	8,0%	5	38,5%	
Mib-1					0,0422
negativo	5	20,0%	7	58,4%	
positivo fraco	19	76,0%	4	33,3%	
positivo forte	1	4,0%	1	8,3%	

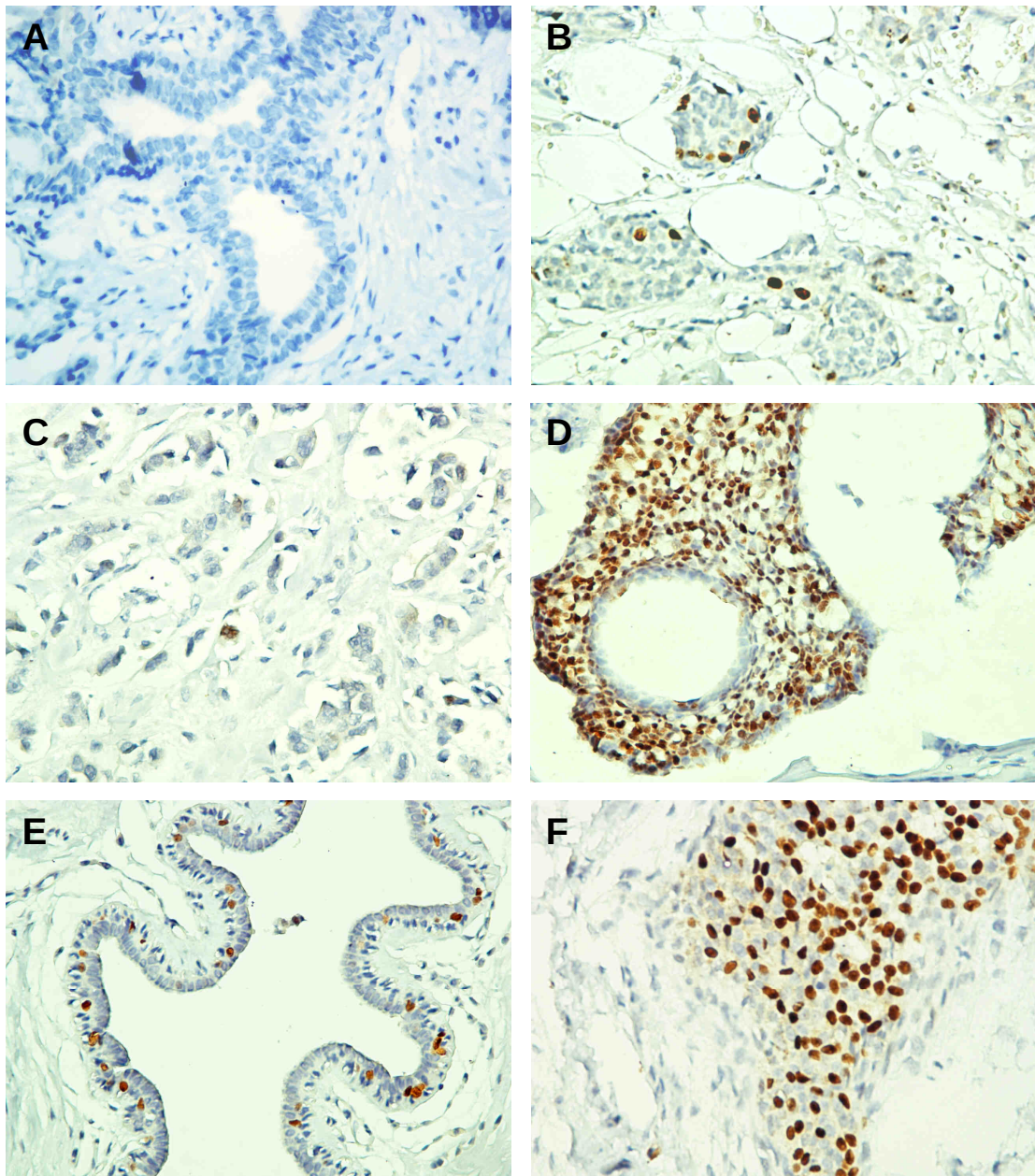


Figura 6 – Cortes histológicos de tecido mamário evidenciando a expressão de marcadores tumorais por imunohistoquímica em diferentes intensidades (400×). **A)** MIB-1 negativo (hiperplasia epitelial sem atipias); **B)** MIB-1 positivo fraco (carcinoma ductal invasivo grau II); **C)** RE positivo fraco (carcinoma ductal invasivo grau II); **D)** RE positivo forte (carcinoma ductal invasivo grau I); **E)** RP positivo fraco (fibroadenoma); **F)** RP positivo forte (fibroadenoma).

5.3. Análise do gene *FHIT*

5.3.1. Análise molecular

O estudo de possíveis alterações moleculares pôde ser realizado em apenas 22 das 26 pacientes com câncer de mama e em 13 das 16 mulheres com alterações mamárias benignas devido à falta de amostra de sangue de algumas pacientes.

Na região não codificadora do gene *FHIT*, onde está localizado o marcador de microssatélite D3S2757, foi observada LOH em três pacientes (13,7%), sendo todas do grupo com carcinoma mamário, enquanto no grupo controle, não houve nenhuma alteração detectável. Ainda na região não codificadora, nenhuma diferença de intensidade dos alelos entre o tecido sanguíneo e o tecido mamário foi observada utilizando o marcador D3S4260, tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle. A retenção de heterozigose foi de 100% (tabela 4).

Foi observada próxima a região codificadora uma taxa superior de perda de heterozigose em relação à região não codificadora. Na região do marcador D3S1300 foram detectadas alterações em seis (27,3%) pacientes com câncer de mama, taxa superior à encontrada no grupo controle, no qual foram verificadas alterações em duas pacientes (15,4%). A maior taxa de polimorfismo entre as diferentes amostras de DNA foi encontrada na região do marcador D3S1234, onde foram observadas alterações em oito (36,4%) pacientes com câncer de mama e em duas (15,4%) mulheres do grupo controle (tabela 4; figura 7).

Analisando a perda de heterozigose em todas as regiões dos marcadores do gene *FHIT* aqui analisados, não houve diferença significativa entre o grupo com câncer e o grupo controle (tabela 4). Entretanto, observou-se a perda de um dos alelos em 13 (59,1%) pacientes com câncer de mama, enquanto que no grupo controle a LOH ocorreu em apenas quatro mulheres (30,7%) (tabela 4).

Tabela 4 – Análise da perda de heterozigose no gene *FHIT* por diferentes marcadores.

Perda de Heterozigose (LOH)					
	Paciente (22)		Controle (13)		Valor-p
	n	%	n	%	
FHIT 2757					0,2352
sim	3	13,7%	0	0,0%	
não	19	83,3%	13	100,0%	
FHIT 4260					-
sim	0	0,0%	0	0,0%	
não	22	100,0%	13	100,0%	
FHIT 1300					0,6945
sim	6	27,3%	2	15,4%	
não	16	72,7%	11	84,6%	
FHIT 1234					0,1092
sim	8	42,1%	2	15,4%	
não	11	57,9%	11	84,6%	
não amplificado	3		0		
FHIT (todos marcadores)					0,1052
sim	13	59,1%	4	30,7%	
não	9	40,9%	9	69,3%	

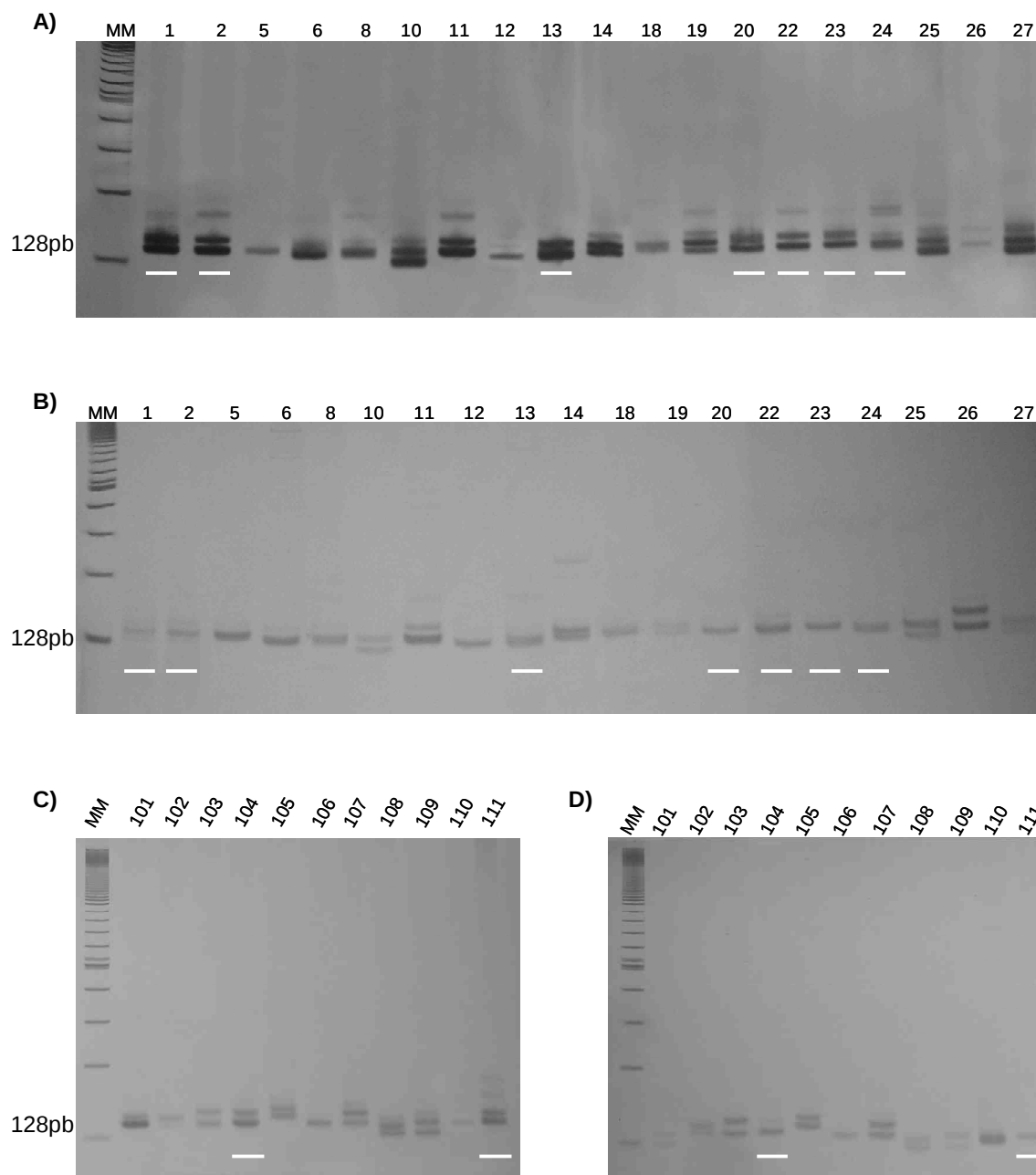


Figura 7 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a perda de heterozigose no gene *FHIT* pela amplificação do iniciador D3S1234. A) Sangue casos; B) Tecido mamário casos; C) Sangue controle; D) Tecido mamário controle. As barras indicam as amostras em que foi observada a perda de um dos alelos no tecido tumoral.

5.3.1.1 Perda de heterozigose (LOH) no gene *FHIT* x parâmetros tumorais

A perda de heterozigose foi observada em diferentes graus de diferenciação tumoral, ocorrendo em cinco (62,5%) das oito pacientes com CDI grau I, em seis (54,5%) das 11 pacientes CDI grau II e em uma (50%) das duas pacientes com CDI grau III. Também foi observada LOH na única paciente com carcinoma ductal *in situ* (tabela 5).

No grupo controle a perda de heterozigose ocorreu em uma (14,3%) das sete pacientes com fibroadenoma, em duas (66,7%) das três pacientes com hiperplasia epitelial e na única paciente com metaplasia mióide. Entre as pacientes com hipertrofia mamária e com lipoma, não foi observada nenhuma alteração em toda a região estudada do gene *FHIT* (tabela 5).

Com relação ao tamanho tumoral e ao comprometimento axilar, a perda de heterozigose foi observada principalmente nos tumores menores que 2 cm e em tumores que não tiveram comprometimento axilar, sem diferenças significativas (tabela 6).

Analizando a expressão dos receptores hormonais nas pacientes com alterações no gene *FHIT*, não houve diferença significativa entre o grupo com carcinoma e grupo controle quanto à expressão de RE e RP. Entre os casos de carcinoma com perda de heterozigose, 61,5% (8) dos carcinomas expressaram RE fortemente, 15,4% (2) fracamente e 23,1% (3) não expressaram RE. No grupo controle com LOH em *FHIT*, a expressão do RE nas alterações variou entre positivo forte (50,0%, n=2) e positivo fraco (50,0%, n=2). Com relação ao RP, a

maioria dos casos de carcinoma com LOH a expressão foi fraca (69,2%, n=9) e em 23,1% (3) a expressão foi negativa (tabela 7).

Tabela 5 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene *FHIT* e alterações mamárias.

LOH FHIT					
Casos	Sim		Não		Valor-p
	n	%	n	%	
					0,8270
Carcinoma ductal invasivo grau I	5	62,5%	3	37,5%	
Carcinoma ductal invasivo grau II	6	54,5%	5	45,5%	
Carcinoma ductal invasivo grau III	1	50,0%	1	50,0%	
Carcinoma ductal in situ	1	100,0%	0	0,0%	
Controles					0,3214
Fibroadenoma	1	14,3%	6	85,7%	
Hiperplasia epitelial sem atipias	2	66,7%	1	33,3%	
Hipertrofia mamária	0	0,0%	1	100,0%	
Lipoma	0	0,0%	1	100,0%	
Metaplasia mióide	1	100,0%	0	0	

Tabela 6 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene *FHIT* e parâmetros.

	LOH FHIT				Valor-p
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Tamanho tumoral					0,5520
< 1 cm	10	83,3%	2	60,0%	
1-2 cm					
> 2 cm	2	16,7%	2	40,0%	
Comprometimento de linfonodos axilares					0,3859
0	10	83,3%	7	100,0%	
≥ 3	2	16,7%	0	0,0%	

Houve uma diferença de expressão da proteína Mib-1 entre as pacientes com perda de heterozigose do grupo com carcinoma e o grupo controle. No

primeiro grupo, 76,9% (10) dos carcinomas expressaram Mib-1 fracamente, enquanto que, no segundo, em 100% (4) das alterações a expressão de Mib-1 foi negativa (tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) em relação aos marcadores tumorais.

FHIT LOH													
		Casos (21) *				Controles (11)							
		Sim		Não		Valor-p		Sim		Não		Valor-p	
Receptor de estrógeno						0,4558						0,6515	
negativo		3	23,1%	2	22,2%			0	-	0	-		
positivo fraco		2	15,4%	3	33,3%			2	50,0%	3	42,9%		
positivo forte		8	61,5%	3	33,3%			2	50,0%	4	57,1%		
Receptor progesterona						0,3552						0,1099	
negativo		3	23,1%	4	44,4%			1	25,0%	0	0,0%		
positivo fraco		9	69,2%	3	33,3%			1	25,0%	6	85,7%		
positivo forte		1	6,7%	1	11,1%			2	50,0%	1	14,3%		
Mib-1						0,8355						0,1659	
positivo fraco		3	23,1%	1	12,5%			4	100,0%	3	42,9%		
positivo forte		10	76,0%	7	87,5%			0	-	4	57,1%		

* Não foi realizado IH em uma paciente com carcinoma por falta de amostra tumoral no bloco de parafina

5.3.1.2 Perda de heterozigose (LOH) no gene *FHIT* x parâmetros clínicos

Analisando apenas as pacientes que apresentaram perda de heterozigose no gene *FHIT*, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados (grupo com carcinoma e grupo controle) e a maioria dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene *FHIT* em relação às características clínicas e biológicas

FHIT LOH					
	Casos (13)		Controles (4)		Valor-p
	n	%	n	%	
Idade					0,4792
< 50	5	38,5%	3	75,0%	
≥ 50	8	61,5%	1	25,0%	
Etnia					0,9159
caucasianos	9	69,2%	2	50,0%	
negróides	4	30,8%	2	50,0%	
Óbito					0,6190
sim	0	0,0%	0	0,0%	
não	13	100,0%	4	100,0%	
História familiar de câncer de mama					0,3004
sim	4	30,8%	0	0,0%	
não	9	69,2%	4	100,0%	
Menarca					0,8777
precoce (≤ 12 anos)	5	38,5%	2	50,0%	
normal (13-15 anos)	5	38,5%	1	25,0%	
tardia (≥ 16 anos)	3	23,0%	1	25,0%	
Menopausa					0,0967
sim	11	84,6%	1	25,0%	
não	2	15,4%	3	75,0%	
					0,1946
precoce (< 40 anos)	2	18,2%	1	100,0%	
normal (40-50 anos)	6	54,5%	0	0,0%	
tardia (> 50 anos)	3	27,3%	0	0,0%	
1ª gestação					0,7806
< 30 anos	9	69,2%	2	50,0%	
≥ 30 anos	2	15,4%	1	25,0%	
nulípara	2	15,4%	1	25,0%	
Anticoncepcional					0,5520
sim	4	30,7%	0	0,0%	
não	9	69,2%	4	100,0%	
Fumo					0,6613
sim	7	53,8%	1	25,0%	
não	6	46,2%	3	75,0%	
Bebida					0,9583
sim	1	7,7%	1	25,0%	
não	12	92,3%	3	75,0%	

Então, para verificar a relação entre as alterações no gene *FHIT* e os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, as pacientes foram agrupadas independentemente do grupo ao qual pertenciam (grupo com carcinoma ou grupo controle) (tabela 9). Não houve relação entre alterações no gene *FHIT* e a faixa etária, etnia, história familiar de câncer de mama ou hábitos da paciente (fumo e bebida). Quanto aos antecedentes ginecológicos, também não foi observada relação entre LOH em *FHIT* e idade de menarca, idade da primeira gestação a termo ou uso de pílula anticoncepcional, porém houve diferença em relação à menopausa. Enquanto 70,6% (12) das pacientes com perda de heterozigose se encontravam na pós-menopausa, 76,5% (13) das pacientes que não apresentaram alterações em *FHIT* estavam na pré-menopausa ($p=0,005$).

5.3.2. Análise da expressão da proteína Fhit

Foi realizada imunohistoquímica (IH) nos tecidos mamários de 25 pacientes com carcinoma mamário das quais 96% (24) expressaram a proteína Fhit fortemente e em 4% (1) a expressão de Fhit foi negativa. No grupo controle foi realizada IH em 13 pacientes, cuja expressão de Fhit foi forte em 84,6% (11) e negativa em 15,4% (2) (tabela 10, figura 8).

Não houve diferença na expressão da proteína Fhit entre as pacientes que apresentaram ou não perda de heterozigose no gene *FHIT*. No grupo com carcinoma, todas as pacientes com (13) ou sem (9) alteração gênica expressaram

a proteína Fhit fortemente. No grupo controle, das quatro pacientes com LOH no gene *FHIT*, foi observada uma forte expressão protéica em 75% (3) das pacientes e expressão negativa em 25% (1). Ainda nesse grupo, entre as mulheres em que não foram observadas alterações no gene *FHIT*, a expressão de Fhit foi forte em 85,7% (6) das pacientes e negativa em uma paciente (14,3%) (tabela 11).

Tabela 9 - Distribuição das pacientes (casos e controle) em relação às características clínicas e biológicas e perda de heterozigose no gene *FHIT*.

FHIT LOH					
	Sim (17)		Não (18)		Valor-p
	n	%	n	%	
Idade					0,8694
< 50	8	47,1%	10	55,6%	
≥ 50	9	52,9%	8	44,4%	
Etnia					0,8994
caucasianos	11	64,7%	11	61,1%	
negróides	6	35,3%	7	38,9%	
Óbito					0,6190
sim	0	0,0%	1	0,0%	
não	17	100,0%	17	100,0%	
História familiar de câncer de mama					0,6214
sim	4	23,5%	6	37,5%	
não	13	76,5%	10	62,5%	
Menarca					0,3120
precoce (≤ 12 anos)	7	41,2%	10	58,8%	
normal (13-15 anos)	6	35,3%	6	35,9%	
tardia (≥ 16 anos)	4	23,5%	1	5,8%	
Menopausa					0,0059
sim	12	70,6%	4	23,5%	
não	5	29,4%	13	76,5%	
					0,4493
precoce (< 40 anos)	3	25,0%	0	0,0%	
normal (40-50 anos)	6	50,0%	2	50,0%	
tardia (> 50 anos)	3	25,0%	2	50,0%	
1ª gestação					0,5580
< 30 anos	11	64,7%	13	76,5%	
≥ 30 anos	3	17,6%	3	17,6%	
nulípara	3	17,6%	1	5,9%	
Anticoncepcional					0,4515
sim	4	23,5%	6	35,3%	
não	13	76,5%	11	64,7%	
Fumo					0,1511
sim	8	47,1%	4	23,5%	
não	9	52,9%	13	76,5%	
Bebida					0,4660
sim	2	11,8%	0	0,0%	
não	15	88,2%	17	100,0%	

Tabela 10 - Correlação entre expressão da proteína e os grupos com carcinoma (caso) e grupo controle.

	Casos (25)		Controles (13)		Valor-p
	n	%	n	%	
Expressão de Fhit					0,2169
negativo	1	4,0%	2	15,4%	
positivo fraco	0	0,0%	0	0,0%	
positivo forte	24	96,0%	11	84,6%	

Tabela 11 - Correlação entre expressão da proteína Fhit e a perda de heterozigose no gene *FHIT* nos grupos com carcinoma (caso) e grupo controle

FHIT LOH										
	Casos (21)					Controles (11)				
	Sim		Não		Valor-p	Sim		Não		Valor-p
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Expressão Fhit					0,6084					0,6323
negativo	0	0,0%	0	0,0%		1	25,0%	1	14,3%	
positivo fraco	0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%	
positivo forte	13	100.0%	8	100.0%		3	75.0%	6	85.7%	

Comparando somente as pacientes com alteração no gene *FHIT* entre o grupo caso e controle, no grupo com carcinoma 100% (13) das pacientes com LOH no gene *FHIT* apresentaram uma forte expressão da proteína. No grupo controle a maioria das pacientes (75%, n=3) com alterações gênicas apresentaram uma forte expressão protéica, porém uma paciente com LOH não apresentou expressão de Fhit (p=0,06) (tabela 12).

Tabela 12 - Correlação entre expressão da proteína e os grupos com carcinoma (caso) e grupo controle com alterações em *FHIT*.

FHIT LOH					
	Casos (13)		Controles (4)		Valor-p
	n	%	n	%	
Expressão de FHIT					0,0631
negativo	0	0,0%	1	25,0%	
positivo fraco	0	0,0%	0	0,0%	
positivo forte	13	100,0%	3	75,0%	

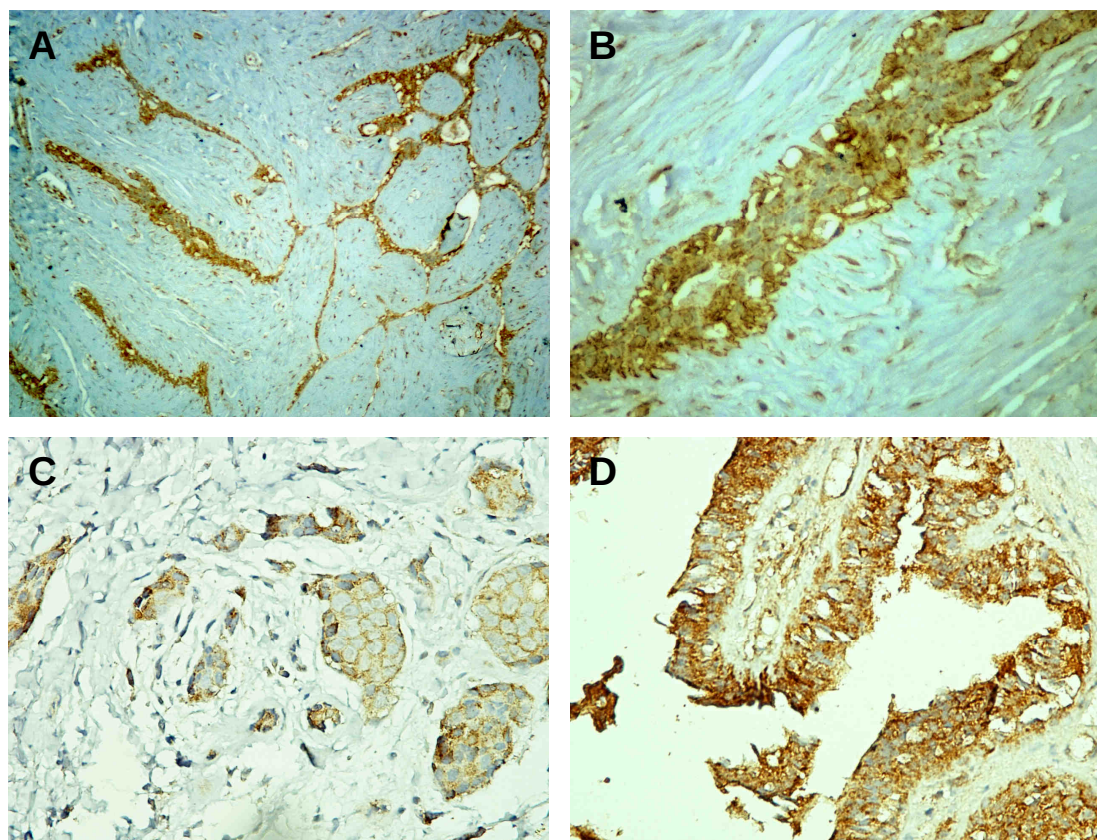


Figura 8 - Cortes histológicos de tecido mamário evidenciando a expressão da proteína Fhit pela coloração imunohistoquímica. **A)** Controle positivo (100x); **B)** Controle positivo (400x); **C)** Carcinoma ductal invasivo grau II expressando Fhit fortemente (400x); **D)** Hiperplasia epitelial sem atipias expressando Fhit fortemente (400x).

5.4. Análise do gene *ATR*

5.4.1. Análise molecular

Para analisar possíveis alterações no gene *ATR* foram utilizados três marcadores de microssatélites. Na região do marcador ATR1316 foi observada alteração em uma (4,5%) paciente com carcinoma mamário e em duas (15,4%) pacientes do grupo controle (tabela 13; figura 9).

Algumas amostras de tecido não amplificaram utilizando o marcador ATR 3694, sendo três do grupo de pacientes com carcinoma e quatro do grupo controle. No primeiro grupo, entre as 19 amostras amplificadas, apenas em uma (5,3%) paciente foi observada a perda de heterozigose. No grupo controle nenhuma paciente apresentou alteração na região deste marcador (tabela 13).

Tabela 13 - Análise da perda de heterozigose no gene *ATR* por diferentes marcadores.

LOH ATR					
	Casos (22)		Controles (13)		Valor-p
	n	%	n	%	
ATR 1316					0,6298
sim	1	4,5%	2	15,4%	
não	21	95,5%	11	84,6%	
ATR 3694					0,6785
sim	1	5,3%	0	0,0%	
não	18	94,7%	9	100,0%	
não amplificado	3		4		
ATR 3710					0,3882
sim	2	9,1%	0	0,0%	
não	20	90,9%	13	100,0%	
ATR (todos marcadores)					0,8010
sim	4	18,2%	2	15,4%	
não	18	81,8%	11	84,6%	

Na região do marcador ATR3710 foram detectadas LOH em duas (9,1%) pacientes do grupo com câncer. Já no grupo controle, a retenção foi de 100%.

Analisando toda a extensão estudada do gene *ATR* coberta pelos três pares iniciadores não houve diferença significativa quanto à presença de polimorfismos entre o grupo com câncer e o grupo controle (tabela 13). Por todo o gene foi observada perda de heterozigose em quatro pacientes com carcinoma mamário e em duas pacientes com alterações mamárias benignas (tabela 13).

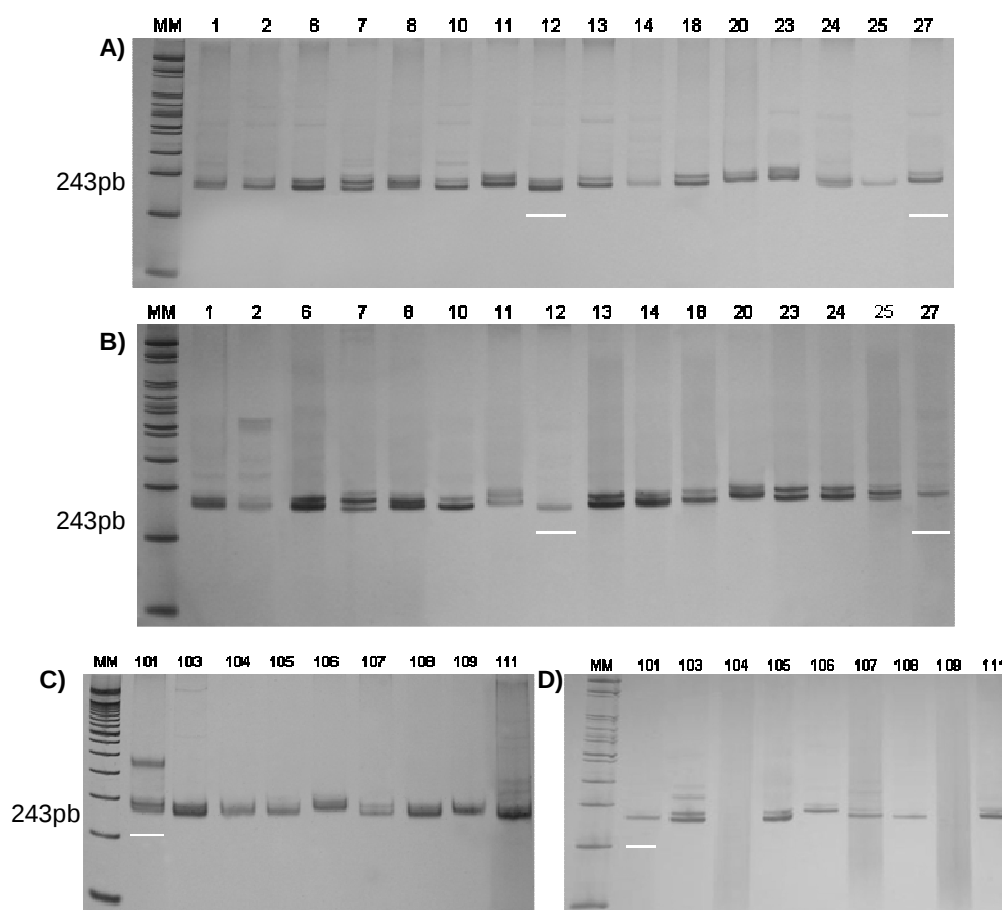


Figura 9 - Gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata evidenciando a LOH no gene *ATR* pela amplificação do iniciador ATR1316. A) Sangue casos. B) Tecido mamário casos. C) Sangue controle. D) Tecido mama controle. As barras indicam as amostras em que foi observada a perda de um dos alelos no tecido tumoral.

5.4.1.1 Perda de heterozigose (LOH) no gene *ATR* x parâmetros tumorais

Nenhuma alteração no gene *ATR* foi observada nas pacientes com carcinoma ductal invasivo grau I (n=8), CDI grau III (n=2) ou carcinoma ductal *in situ* (n=1). Apenas no grupo classificado como CDI grau II foi observada LOH em quatro (36,4%) pacientes (tabela 14).

No grupo com alterações mamárias benignas a perda de heterozigose no gene *ATR* foi detectada em apenas duas pacientes, uma com hipertrofia mamária e outra com metaplasia mióide (tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene *ATR* e alterações mamárias.

LOH ATR					
Casos (22)	Sim		Não		Valor-p
	n	%	n	%	
Carcinoma ductal invasivo grau I	0	0,0%	8	100,0%	0,9801
Carcinoma ductal invasivo grau II	4	36,4%	7	63,6%	
Carcinoma ductal invasivo grau III	0	0,0%	2	100,0%	
Carcinoma in situ	0	0,0%	1	100,0%	
Controles (13)					
Fibroadenoma	0	0,0%	7	100,0%	-
Hiperplasia epitelial	0	0,0%	3	100,0%	
Hipertrofia mamária	1	100,0%	0	0,0%	
Lipoma	0	0,0%	1	100,0%	
Metaplasia	1	100,0%	0	0,0%	

Não houve diferença significativa entre a presença de alteração no gene *ATR* e o tamanho tumoral ou o comprometimento axilar. A maioria dos tumores com alteração (75%, n=3) e sem alteração (76,9%, n=10) em *ATR* apresentaram

diâmetro inferior a 2 cm (tabela 15). Quanto ao comprometimento axilar, das duas pacientes com linfonodos positivos, uma apresentou LOH em *ATR*.

Também não houve diferença entre os dois grupos com perda de heterozigose e os marcadores tumorais RE, RP e Mib-1 (tabela 16).

Tabela 15 - Distribuição das pacientes quanto à perda de heterozigose (LOH) no gene *ATR* e parâmetros tumorais.

LOH ATR						
		Sim		Não		Valor-p
		n	%	n	%	
Tamanho tumoral						0,8492
< 1 cm		3	75,0%	10	76,9%	
1-2 cm						
> 2 cm		1	25,0%	3	23,1%	
Comprometimento de linfonodos axilares						0,8849
0		3	75,0%	14	93,3%	
≥ 3		1	25,0%	1	6,7%	

Tabela 16 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene *ATR* em relação aos marcadores tumorais.

	ATR LOH				Valor-p
	Casos (4)		Controles (2)		
	n	%	n	%	
Receptor de estrógeno					0,2231
negativo	2	50,0%	0	0,0%	
positivo fraco	2	50,0%	1	50,0%	
positivo forte	0	0,0%	1	50,0%	
Receptor de progesterona					0,8000
negativo	2	50,0%	1	50,0%	
positivo fraco	2	50,0%	1	50,0%	
positivo forte	0	0,0%	0	0,0%	
Mib-1					0,2000
negativo	1	25,0%	2	100,0%	
positivo fraco	3	75,0%	0	0,0%	
positivo forte	0	0,0%	0	0,0%	

5.4.1.2 Perda heterozigose (LOH) no gene *ATR* x parâmetros clínicos

Semelhante ao observado durante a análise do gene *FHIT*, não houve diferença significativa entre as pacientes que apresentaram perda de heterozigose no gene *ATR* dos grupos com carcinoma e controle e a maioria dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (tabela 17). Assim, para verificar a relação entre as alterações no gene *ATR* e esses fatores as pacientes foram agrupadas independentemente do grupo ao qual pertenciam (tabela 18). Não houve relação entre a perda de heterozigose no gene *ATR* e nenhum dos fatores analisados.

5.4.2. Alteração em *ATR* X alteração em *FHIT*

Para verificar a relação entre as alterações no gene *ATR* e alterações no gene *FHIT* agruparam-se as pacientes independentemente do grupo a que pertenciam (grupo com carcinoma ou grupo controle).

Entre as 35 mulheres em que os genes *FHIT* e *ATR* foram analisados, 17 apresentaram alterações em *FHIT* e seis, alterações em *ATR*. Entre as pacientes com alteração no gene *ATR*, quatro (66,7%) apresentaram também alteração no gene *FHIT* e duas (33,3%) apresentaram alteração somente em *ATR*. Treze pacientes apresentaram alteração somente em *FHIT* e 16 pacientes não apresentaram alterações em *FHIT* nem *ATR* (tabela19).

Os resultados da análise molecular dos genes *FHIT* e *ATR* e

imunohistoquímica estão resumidos nas tabelas 20 e 21.

Tabela 17 - Distribuição das mulheres com câncer de mama (casos) e mulheres com alterações mamárias benignas (grupo controle) com perda de heterozigose no gene *ATR* em relação às características clínicas e biológicas.

	ATR LOH				Valor-p
	Casos (4)		Controles (2)		
	n	%	n	%	
Idade					0,2000
< 50	1	25,0%	2	100,0%	
≥ 50	3	75,0%	0	0,0%	
Etnia					0,2000
caucasianos	3	75,0%	0	0,0%	
negróides	1	25,0%	2	100,0%	
Óbito					0,6190
sim	0	0,0%	0	0,0%	
não	4	100,0%	2	100,0%	
História familiar de câncer de mama					0,6000
sim	2	50,0%			
não	2	50,0%	0	0,0%	
			2	100,0%	
Menarca					0,6000
precoc (≤ 12 anos)	1	25,0%	1	50,0%	
normal (13-15 anos)	3	75,0%	1	50,0%	
tardia (≥ 16 anos)	0	0,0%	0	0,0%	
Menopausa					0,2000
sim	3	75,0%	0	0,0%	
não	1	25,0%	2	100,0%	
					-
precoc (< 40 anos)	1	33,3%	0	0,0%	
normal (40-50 anos)	1	33,3%	0	0,0%	
tardia (> 50 anos)	1	33,3%	0	0,0%	
1ª gestação					0,2231
< 30 anos	1	25,0%	2	100,0%	
≥ 30 anos	2	50,0%	0	0,0%	
nulípara	1	25,0%	0	0,0%	
Anticoncepcional					0,3271
sim	2	50,0%	0	0,0%	
não	2	50,0%	2	100,0%	
Fumo					0,7594
sim	1	25,0%	1	50,0%	
não	3	75,0%	1	50,0%	
Bebida					0,3333
sim	0	0,0%	1	50,0%	
não	4	100,0%	1	50,0%	

Tabela 18 - Distribuição das pacientes (casos e controle) em relação às características clínicas e biológicas e perda de heterozigose no gene *ATR*.

	ATR LOH				Valor-p
	Sim (6)		Não (29)		
	n	%	n	%	
Idade					0,7100
< 50	3	50,0%	15	51,7%	
≥ 50	3	50,0%	14	48,3%	
Etnia					0,8010
caucasianos	3	50,0%	19	65,4%	
negróides	3	50,0%	10	34,5%	
Óbito					0,8285
sim	0	0,0%	1	3,4%	
não	6	100,0%	28	96,6%	
História familiar de câncer de mama					0,9872
sim	2	33,3%	8	28,6%	
não	4	66,7%	20	71,4%	
Menarca					0,1703
precoce (≤ 12 anos)	2	33,3%	15	53,6%	
normal (13-15 anos)	4	66,7%	8	28,6%	
tardia (≥ 16 anos)	0	0,0%	5	17,9%	
Menopausa					0,7706
sim	3	50,0%	13	46,4%	
não	3	50,0%	15	53,6%	
					0,7301
precoce (< 40 anos)	1	33,3%	2	15,4%	
normal (40-50 anos)	1	33,3%	7	53,5%	
tardia (> 50 anos)	1	33,3%	4	30,7%	
1ª gestação					0,4488
< 30 anos	3	50,0%	21	75,0%	
≥ 30 anos	2	33,3%	4	14,3%	
nulípara	1	16,7%	3	10,7%	
Anticoncepcional					0,7931
sim	2	33,3%	8	28,6%	
não	4	66,7%	20	71,4%	
Fumo					0,7189
sim	2	33,3%	10	35,7%	
não	4	66,7%	18	64,3%	
Bebida					0,7785
sim	1	16,7%	1	3,6%	
não	5	83,3%	27	96,4%	

Tabela 19 - Relação entre perda de heterozigose no gene *ATR* e alterações em *FHIT*.

LOH FHIT	LOH ATR				Valor-p 0,3299
	Sim (6)		Não (29)		
sim	4	66,7%	13	44,8%	
não	2	33,3%	16	55,2%	

Tabela 20 - Análise de perda de heterozigose nos genes *FHIT* e *ATR* em regiões de diferentes marcadores.

LOH									
Casos (22)	FHIT				Alterações	ATR			
	2757	4260	1300	1234		1316	3694	3710	Alterações
1	-	-	+	+	2	-	NA	-	-
2	-	-	+	+	2	-	NA	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	1	-	-	-	-
7	-	-	+	NA	1	-	-	+	1
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	1	+	-	-	1
13	-	-	+	+	2	-	-	-	-
14	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
15	-	-	-	NA	-	-	NA	+	1
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	-	1	-	-	-	-
19	+	-	-	-	1	-	+	-	1
20	-	-	-	+	1	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	NA	-	-	-
22	+	-	-	+	2	-	-	-	-
23	-	-	-	+	1	-	-	-	-
24	-	-	-	+	1	-	-	-	-
25	-	-	+	-	1	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	3	0	6	8		1	0	2	
Controles (13)									
101	-	-	-	-	-	+	-	-	1
102	-	-	+	-	1	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	+	1	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	NA	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	NA	-	-
109	-	-	-	-	-	-	NA	-	-
110	-	-	-	+	1	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	+	-	1	+	-	-	1
Total	0	0	2	2		2	0	0	

NA = não amplificado

Tabela 21 - Resumo das reações imunohistoquímicas.

		Imunohistoquímica				
		Diagnóstico	FHIT	Estrogênio	Progesterona	MIB
Casos						
1	CDI mucinoso grau I		+++	+++	+	+
2	CDI grau I		++++	+++	++++	+
3	CDI grau II		++++	+++	+	+
5	CDI apócrino grau II		++++	neg	neg	+
6	CDI mucinoso grau I		++++	++++	++	+
7	CDI grau II		++++	neg	++	++
8	CDI grau II + Paget		++++	neg	neg	++
9	CDI apócrino grau II		++++	++++	+	++
10	CDI grau I		++++	++++	++++	+
11	CDI grau II		++++	++++	neg	++
12	CDI mucinoso grau II		+++	++	neg	++
13	CDI grau II		++++	+	++	++
14	CDI mucinoso grau I		++++	++	++	+
15	CDI grau II		+++	+	neg	neg
16	CDI grau I		++++	+++	+	neg
17	CDI grau II		+++	++++	++	+
18	CDI grau III		++++	+++	++	++
19	CDI apócrino grau II		++++	neg	+	++
20	CDI grau I		++++	+++	+	neg
21	CDI grau I		++++	++	++	+
22	CDI grau II		++++	neg	neg	++
23	CDIS		+++	++++	++	neg
24	CDI grau I		++++	++++	neg	neg
25	CDI grau II		+++	+++	+	++
26	CDI grau III		NR	NR	NR	NR
28	CDI grau III		neg	neg	neg	++++
Controles						
27	Metaplasia Mióide		neg	+++	neg	neg
101	hipertrofia mamária		++++	++	++	neg
102	hiperplasia epitelial sem atípias		++++	++	++++	neg
103	hiperplasia epitelial sem atípias		neg	++++	++	neg
104	hiperplasia epitelial sem atípias		++++	+++	++++	neg
105	Fibroadenoma		++++	++	+	neg
107	Fibroadenoma		++++	++++	++	+
108	Fibroadenoma		++++	++	++	+
109	Fibroadenoma		++++	++++	++	+
111	Fibroadenoma		+++	++	+	neg
112	Mastite crônica		++++	++++	+++	++++
114	Alteração fibrocística		++++	+++	++++	NR
115	Fibroadenoma		++++	++++	++++	+

CDI = carcinoma ductal invasivo

CDIS = carcinoma ductal *in situ*

NR = não realizado

Neg = negativo

+ / ++ = positivo fraco

+++ / ++++ = positivo forte

Discussão

6. DISCUSSÃO

As taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama têm sido associadas a diferentes fatores de risco e, alguns desses fatores, como idade, genética, história reprodutiva (idade de menarca, menopausa e número de gestações) e etnia, são incontroláveis, não podendo ser modificados na tentativa de diminuir a incidência de câncer de mama.

O gênero sexual é o principal fator de risco não modificável relativo ao desenvolvimento do câncer de mama, atingindo principalmente o sexo feminino. Além disso, na mulher, ao decorrer dos anos, o risco de aparecimento de câncer mamário aumenta consideravelmente. O grupo de pacientes com carcinoma aqui estudado apresentou uma média de idade de 55 anos, sendo que 69,3% estão acima da faixa de 50 anos, concordando com a literatura. DRAPER (2006) descreve que, entre todos os casos de câncer de mama, 75% ocorrem em mulheres acima dos 50 anos e que a chance de uma mulher vir a desenvolver este carcinoma é de uma em 50 aos 50 anos e uma em 24 aos 60 anos. Segundo FRIEDENREICH *et al.* (2001), mulheres acima dos 50 anos têm um risco relativo de desenvolver câncer de mama quatro vezes maior que mulheres abaixo dos 50 anos.

Foi observada uma diferença de idade entre os grupos com carcinoma e controle, em que neste a média de idade foi inferior (40,1 anos), que pode ser explicada devido ao tipo de alteração. Segundo GURAY & SAHIN (2006) a incidência de alterações benignas ocorre durante a segunda década de vida com pico na quarta década, opondo-se às doenças malignas, em que a taxa de

incidência continua aumentando, principalmente após a menopausa.

Etnia é outro fator de risco incontrolável para o desenvolvimento de câncer de mama. Observamos uma maior incidência desse tipo tumoral entre as mulheres brancas (76,9%) enquanto não houve diferença na incidência de alterações benignas entre os grupos raciais. Dados da literatura relatam uma maior freqüência de carcinoma mamário entre as caucasianas, contudo isso não é nítido até os 40 anos de idade, tornando-se marcante somente após a menopausa (CHAGAS, 2001; FRIEDENREICH *et al.*, 2001). A etnia é considerada fator de risco pequeno, mas não desprezível. Estatísticas americanas indicam que mulheres negras são mais propensas a morrer de câncer de mama que mulheres brancas (DRAPER, 2006). Essas diferenças entre as raças podem estar relacionadas a hábitos alimentares, práticas culturais e status socioeconômico.

A genética, ou história familiar, corresponde a somente 5% dos casos, ou a 25% quando a doença aparece em mulheres jovens ainda na pré-menopausa (INCA, 2007). Em nosso trabalho, a minoria das mulheres com carcinoma disseram que possuíam parentes afetados, sendo a taxa menor ainda (7,6%) quando se tratavam de mãe ou irmã. Segundo FRIEDENREICH *et al.* (2001), o risco de desenvolver câncer de mama é quatro vezes maior em mulheres que possuem mãe ou irmã com câncer bilateral na pré-menopausa ou dois familiares de primeiro grau com qualquer forma de câncer de mama. Já o risco relativo em mulheres com história de um familiar de 1º grau com qualquer forma de câncer de mama é de duas a três vezes maior que em mulheres que não apresentam história familiar da doença.

Não encontramos nenhuma relação quanto à idade de menarca, primeira

gravidez a termo ou nuliparidade e o desenvolvimento de câncer de mama, talvez devido ao baixo número de indivíduos, porém encontramos diferença significativa entre os grupos quanto ao estado fértil. Dois terços das mulheres com carcinoma já estavam na pós-menopausa enquanto que no controle 87,5% ainda estava na menacme. Essa diferença pode estar relacionada à diferença de idade entre os grupos com carcinoma e controle.

Já está bem estabelecido que a idade de menarca, paridade, idade na ocasião da primeira gravidez a termo e menopausa são fatores de risco relevantes, sendo a menopausa considerada o fator de risco mais importante. Por trás disso está uma relação positiva entre o número aumentado de ciclos ovulatórios e o risco de desenvolver câncer de mama (PETTERS *et al.*, 1994; PINOTTI *et al.*, 2000).

Neste trabalho, entre as mulheres com carcinoma na senectude, a menopausa ocorreu tardiamente em aproximadamente 31,3%, posterior aos 50 anos. De acordo com CHAGAS (2001) e EASTON (2002), em mulheres com menopausa natural, quando a última menstruação ocorreu após os 55 anos de idade, o risco de desenvolver câncer de mama é duas vezes superior em comparação com mulheres que apresentaram menopausa antes dos 45 anos.

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama podem ser modificados na tentativa de diminuir a incidência dessa doença. Esses fatores estão relacionados com o estilo de vida como consumo de álcool, fumo e uso de pílulas anticoncepcionais. Não encontramos diferenças quanto a esses hábitos entre os grupos, porém, entre as mulheres que fumavam, a maioria pertencia ao grupo com carcinoma.

O câncer de mama é uma doença crônica, de evolução imprevisível,

variando muito seu comportamento entre as mulheres, mesmo quando pareadas segundo parâmetros clínicos de maior importância. Existem inúmeros fatores prognósticos no carcinoma de mama invasivo, no entanto, o acometimento de linfonodos, tamanho e grau de tumor representam conjuntamente mais informações de prognóstico que todos os outros reunidos (FALZONI, 2001). Nossos resultados mostraram tumores de pequeno tamanho e de baixo grau de acometimento de linfonodos, demonstrando um melhor prognóstico para as pacientes.

Neste trabalho, 100% dos carcinomas eram de origem ductal, concordando a literatura que descreve que a maioria dos carcinomas invasivos de mama possuem esse tipo histológico (VASQUEZ *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2006). Entre os carcinomas ductais foram diagnosticados os subtipos mucinoso (15,3%) e apócrino (11,5%). Os subtipos de carcinoma ductal tendem a apresentar menor tamanho e maior resposta aos tratamentos hormonioterápicos e, dessa forma, possuem melhor prognóstico que os carcinomas ductais simples (FALZONI, 2001).

Grande parte dos carcinomas foram positivos para receptor de estrógeno (76%) e para receptor de progesterona (68%), o que era esperado devido a estes serem pequenos e de baixo grau. Além disso, os tumores apresentaram baixo índice de proliferação, uma vez que a expressão de MIB-1 foi baixa, demonstrando o bom prognóstico dessas pacientes.

A diferença de expressão de MIB-1 observada entre os grupos com carcinoma e controle é devido às alterações benignas de mama apresentarem alto índice de diferenciação, com baixa proliferação celular. A única alteração benigna com forte coloração para MIB-1 foi uma mastite granulomatosa, explicada

pelo ao alto índice de infiltrado inflamatório.

Os marcadores tumorais são utilizados como fatores preditivos e prognósticos. A positividade dos tumores para RE varia entre 60 e 81% enquanto que para RP a positividade é um pouco menor, entre 44 e 61%, porém, a maioria dos tumores positivos para RP também é positiva para RE. Os tumores positivos para os receptores hormonais geralmente apresentam menor tamanho, menor grau histológico, uma melhor resposta à terapia hormonal e um melhor prognóstico, principalmente nas mulheres na pós-menopausa (CHAUDHURI *et al.*, 1993; EISENBERG & KOIFMAN, 2001; MOLINA *et al.*, 2005; HEENRY & HAYES, 2006).

Recentemente, parâmetros moleculares tumorais têm sido estudados como fatores prognósticos, incluindo genes supressores tumorais e proto-oncogenes. Frequentes deleções genéticas são encontradas na região do gene *FHIT* e foram descritas em aproximadamente 30% dos cânceres de mama (GATALICA *et al.*, 2000; INGVARSSON *et al.*, 2001).

Avaliamos a integridade no locus do gene *FHIT* em 22 pacientes com câncer de mama e em 13 pacientes com alterações mamárias benignas. Observou-se a perda de heterozigose em 59,1% das pacientes com carcinoma mamário e em 30% das pacientes do grupo controle. Frequências menores foram encontradas no trabalho realizado no sul do Brasil por SANTOS *et al.* (2004), no qual os autores encontraram alterações intragênicas em *FHIT* em 6 dos 25 casos (24%), utilizando apenas o marcador D3S1300. A diferença entre as frequências pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizados quatro marcadores diferentes em nosso trabalho, sendo dois (D3S4260 e D3S2757) localizados próximos a regiões não codificantes do gene *FHIT* e outros dois (D3S1300 e

D3S1234) localizados próximos a regiões codificantes, aumento assim a cobertura das regiões intragênicas.

A maior taxa de perda de heterozigose foi encontrada nos marcadores localizados entre os éxons codificantes do gene *FHIT*, especificamente nas regiões próximas aos éxons 5 e 8. Na região do éxon 5 está localizado o sítio mais frágil do genoma humano, o FRA3B. Muitos autores discutem a relação do gene *FHIT* com o processo de carcinogênese, levando em conta que uma simples alteração no sítio frágil localizado na mesma região seria o suficiente para a transformação celular e, assim, colocando em dúvida o papel de supressor tumoral do gene *FHIT*. Contudo, trabalhos como o de SEVIGNANI *et al.* (2003), descrevem que a expressão de Fhit em camundongos *knockout* (*Fhit*^{-/-}) resulta na perda de habilidade na formação de tumores, demonstrando o papel desse gene no processo de carcinogênese e sua possível função como supressor tumoral.

Aberrações encontradas nos transcritos de *FHIT* em câncer de mama são similares às encontradas em carcinomas do trato digestivo, sendo que a maioria dos transcritos tem alterações em éxons codificantes (NEGRINI *et al.*, 1996). O éxon 8, o qual contém o domínio da tríade de histidina, frequentemente está ausente, sugerindo que este éxon contém uma função essencial que está perdida no processo de tumorigênese. A presença da tríade é essencial para a atividade catalítica de Fhit, uma vez que uma simples substituição da histidina central por asparagina leva a perda da capacidade de hidrólise. Entretanto, a proteína Fhit alterada continua suprimindo a formação de tumores, o que demonstra que essa supressão é independente da atividade enzimática Ap3A hidrolase (SIPRASHVILI *et al.*, 1997). Talvez, Fhit funcione como uma importante

molécula sinalizadora em que, através da ligação à Ap3A, determine parada no ciclo celular para o reparo de danos ao DNA ou induza a apoptose (PEKARSKY *et al.*, 2002).

Alterações no gene *FHIT* são consideradas um evento precoce na carcinogênese mamária uma vez que são encontradas desde lesões pré-neoplásicas a estágios avançados de câncer de mama (GATALICA *et al.*, 2000; INGVARSSON *et al.*, 2001). Semelhante à literatura, observamos alterações em *FHIT* no grupo controle, no carcinoma *in situ* e em todos os diferentes graus de carcinoma invasivo. Na hiperplasia, que é considerada uma lesão pré-neoplásica, a LOH foi detectada em dois dos três casos.

HUIPING *et al.* (2000) compararam LOH dentro do gene *FHIT* em câncer de mama lobulares e ductais, encontrando uma associação significativa entre alterações neste gene e o tipo histológico ductal. Como 100% das pacientes com câncer neste trabalho possuíam o tipo ductal não foi possível fazermos essa correlação.

Em relação aos fatores prognósticos convencionais, também não encontramos diferença significativa entre o comprometimento de linfonodos, graus histológicos e a LOH dentro do gene *FHIT*, dados concordantes com SANTOS *et al.* (2004), que não encontraram diferenças na taxa de perda de heterozigose nos diferentes graus de carcinoma invasivo nem em tumores com metástases para linfonodos axilares.

Não houve relação entre a expressão de RE e RP e a presença de LOH em *FHIT*, discordando com INGVARSSON *et al.* (2001) que relatam a associação entre alterações em *FHIT* e reduzidos níveis de RE e RP. E ainda, dentre os carcinomas com alterações em *FHIT* aqui analisados, 76,9% apresentaram

positividade para MIB-1, demonstrando que essas células estão em proliferação, enquanto INGVARSSON *et al.* (2001) descrevem que 45% dos tumores eram positivos para MIB-1.

Análises clinicopatológicas e epidemiológicas em pacientes com carcinoma mamário realizadas por HAYASHI *et al.* (1997) mostraram que alterações em *FHIT* não estão associadas à idade, classificação e tamanho tumoral, história familiar ou estilo de vida dos pacientes, incluindo fumo e consumo de álcool, dados similares aos encontrados neste trabalho. Já CAMPIGLIO *et al.* (1999), observaram uma associação significativa entre LOH do gene *FHIT* com o tamanho tumoral.

SOZZI *et al.* (1998), estudando pacientes com câncer de pulmão, descreveram que aproximadamente 80% dos tumores pulmonares apresentaram perda de heterozigose no locus do gene *FHIT*, a qual foi duas vezes maior em pacientes fumantes que em pacientes não fumantes. Além disso, MORI *et al.* (2000) verificaram uma associação entre o alto consumo de álcool e fumo e a inativação de *FHIT* em pacientes com câncer de esôfago, indicando que *FHIT* pode ser alvo de carcinógenos.

A avaliação de polimorfismos no gene *FHIT* em diferentes grupos étnicos é importante para verificar a possível presença de alterações em determinados marcadores associadas a etnias específicas, porém não foi observada nenhuma relação, talvez devido ao baixo número de indivíduos no estudo.

Reunindo todos os casos de carcinoma e alterações benignas em um mesmo grupo, encontrou-se um dado interessante: uma associação significativa ($p= 0,0059$) entre a menopausa e a perda de heterozigose em *FHIT*, sendo que, pacientes com perda de heterozigose em sua maioria (70,6%) estão na pós

menopausa, enquanto que a maioria das mulheres sem alterações em *FHIT* estão na menacme (tabela 9). Dado este não mostrado em trabalhos anteriores.

ISHII *et al.* (2001) relatam que 80% dos tumores mamários com alterações gênicas apresentam perda ou diminuição significativa da expressão protéica de Fhit. Entretanto, não encontramos relação entre a LOH no gene *FHIT* e alteração na expressão protéica em nenhum dos grupos estudados. Talvez essa proteína possa estar sendo expressa, porém não sabemos se está funcionando, uma vez que foi detectada a presença de alterações intragênicas.

GINESTIER *et al.* (2003) descreveram que todos os tumores mamários com expressão nula da proteína Fhit possuíam alterações gênicas e que 73% dos tumores com expressão protéica diminuída apresentaram LOH, demonstrando a relação entre a expressão da proteína Fhit e alterações no locus do gene. Contudo, encontramos uma paciente com expressão nula da proteína Fhit sem alterações visíveis no gene. Talvez existam alterações em outras regiões não cobertas pelos marcadores utilizados nesse trabalho, ou ainda, outras alterações gênicas, indetectáveis por análise de perda de heterozigose, como mutação pontual ou metilação, que contribuem para níveis anormais de expressão da proteína Fhit (ZOCHBAUER-MULLER *et al.*, 2001).

Além da LOH em *FHIT*, deleções homozigóticas têm sido descritas em carcinomas esporádicos de mama e em alterações mamárias benignas, sendo essas deleções responsáveis pela perda de expressão da proteína Fhit (INGVARSSON *et al.*, 1999). Outros estudos sugerem que a expressão reduzida de mRNA e a alteração gênica também estão associadas à expressão reduzida de Fhit (NEGRINI *et al.*, 1996; AHMADIAN *et al.*, 1997).

Através do acompanhamento a longo prazo das pacientes com câncer de

mama e a análise da expressão de *FHIT*, CASSELI *et al.* (2001) relataram que no grupo de pacientes com bom prognóstico de câncer de mama, a expressão da proteína é normal ou intermediária e está associada à maior sobrevida livre da doença, enquanto que a ausência de Fhit está associada à pior evolução desses tumores.

Os estudos de sobrevida das pacientes com carcinoma sugerem que a expressão do gene *FHIT* separe dois subgrupos de pacientes com distintos prognósticos e que esta proteína possa ser usada como marcador tumoral. Tumores com Fhit negativo são potencialmente mais agressivos, sugerindo um parâmetro para categorizar os indivíduos que necessitam de quimioterapia. Entretanto, a proteína Fhit possui um impacto somente em estágios iniciais do câncer de mama, o qual desaparece em estágios mais avançados (SEVIGNANI *et al.*, 2003).

Embora a função de Fhit ainda não esteja precisamente estabelecida, vários trabalhos sugerem que o gene poderia ser um importante alvo para a terapia gênica e para o desenvolvimento de drogas no futuro, uma vez que demonstra ser um bom marcador de prognóstico em vários tipos de câncer (DUMON *et al.*, 2001; GINESTIER *et al.*, 2003; SEVIGNANI *et al.*, 2003).

Devido à presença de alterações no gene ATM, membro da mesma família do gene ATR, já terem sido descritas em pacientes com câncer de mama e à ausência de estudos de polimorfismos no gene ATR neste tipo tumoral, um dos nossos objetivos foi verificar a possível relação de alterações gênicas em ATR com o carcinoma mamário.

Observaram-se alterações nos diferentes marcadores, ocorrendo alterações em quatro pacientes (18,2%) com câncer de mama e em duas

pacientes (15,4%) com alterações benignas, perfazendo um total de perda em 17% das pacientes. Alterações em *ATR* não foram associadas a nenhum tipo histológico, tamanho tumoral ou comprometimento axilar. Contudo, todas as pacientes com carcinoma e LOH em *ATR* apresentaram tumores de grau II, apesar desse dado não ter sido significativo.

Nenhuma relação entre a perda de heterozigose no gene *ATR* e os fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma foi encontrada devido ao baixo número de alterações gênicas. Contudo, a existência de uma possível associação só pode ser descartada se for realizado um estudo com um número amostral maior.

O número de alterações observadas no gene *ATR* foi inferior às taxas de alterações observadas em *FHIT*. Entre as mulheres estudadas, 17 apresentaram alterações em *FHIT* e apenas 6 apresentaram alterações em *ATR*. Porém, entre aquelas com alterações em *ATR*, 66,7% também apresentaram alterações em *FHIT*. Talvez, essa relação possa se tornar significativa em um grupo maior, com aumento do número de mulheres com alterações em *ATR* e assim demonstrar uma associação entre esses dois genes.

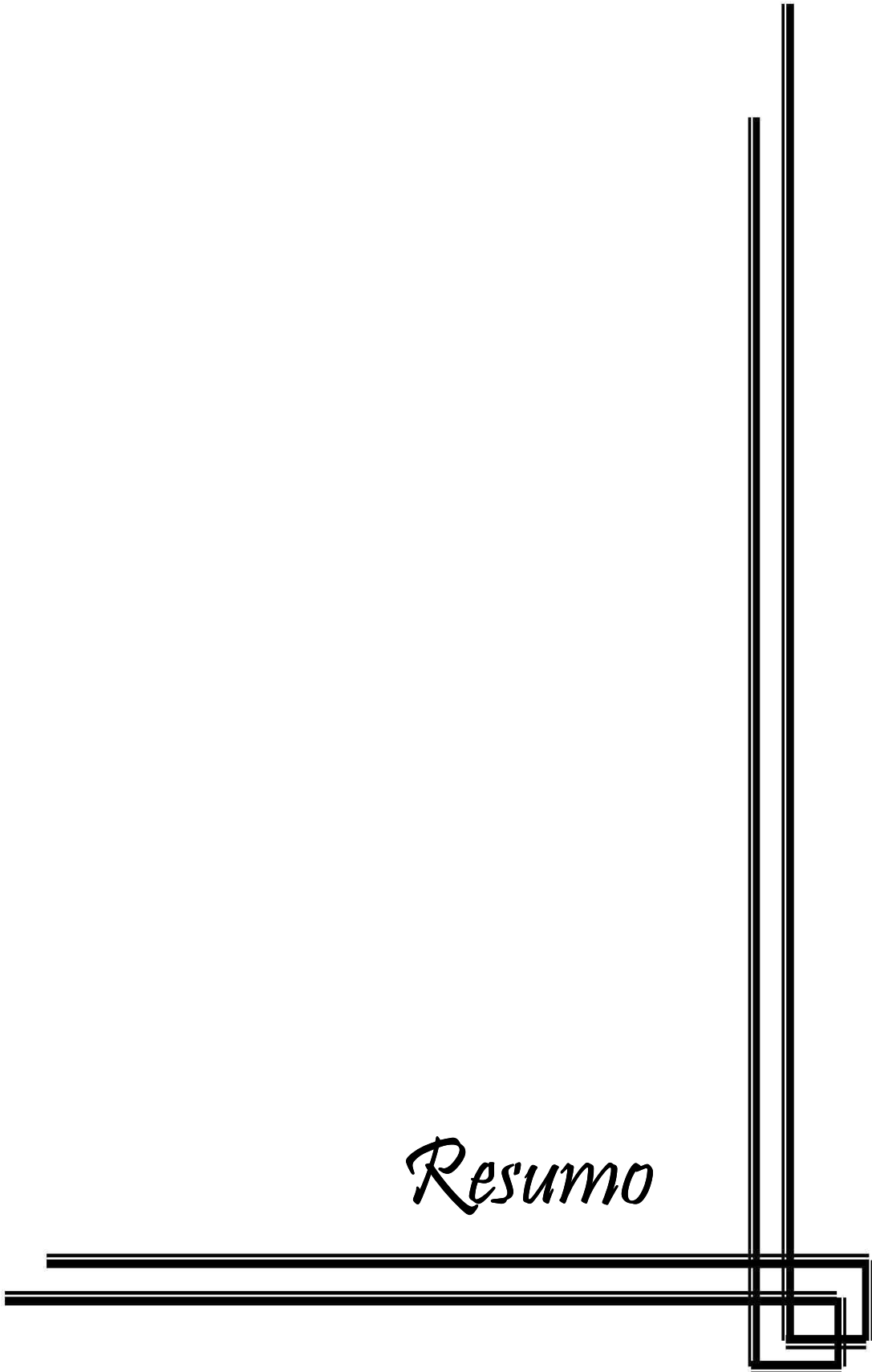
Como alterações no locus de *FHIT* e *ATR* são observadas desde lesões pré-malignas até estágios avançados de câncer de mama, futuros estudos poderiam tentar elucidar o preciso mecanismo de ação de Fhit e Atr no epitélio mamário e o envolvimento dessas proteínas no processo de tumorigênese.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- A LOH no gene *FHIT* ocorreu em 59% das pacientes com câncer de mama e em 30% das pacientes com alterações mamárias benignas;
- A LOH no gene *ATR* ocorreu em 18,2% das pacientes com câncer de mama e em 15,4% das pacientes com alterações mamárias benignas;
- As alterações no locus do gene *FHIT* ocorreram com maior frequência nas proximidades da região codificadora do gene, principalmente próximo ao éxon 5, região onde está presente o sítio frágil FRA3B e próximo ao éxon 8, onde está localizada a tríade de histidina.
- Não houve correlação entre expressão dos marcadores tumorais RE, RP e MIB-1 e a LOH no gene *FHIT*.
- Houve associação entre o término do período fértil e LOH no gene *FHIT*.
- As alterações no gene *FHIT* não alteraram a expressão da proteína Fhit, porém não foi determinado se essa proteína está funcionando.
- 60% das pacientes com LOH em *ATR* também apresentaram LOH em *FHIT*, o que sugere que alterações em *ATR* podem levar a alterações no gene *FHIT*.

Resumo



8. RESUMO

O gene *FHIT* é um supressor tumoral envolvido com o crescimento, proliferação celular e apoptose, encontrando-se freqüentemente inativado em vários tipos de tumores. Em casos de câncer de mama, a perda ou a redução da expressão da proteína Fhit foi associada à progressão tumoral e ao pior prognóstico da doença. Recentemente, foi demonstrado que a quinase ATR participa do *checkpoint* do ciclo celular e exerce um papel crítico na manutenção da estabilidade dos sítios frágeis, sendo que a inativação deste gene resulta instabilidade dos sítios frágeis. O gene *FHIT* contém um dos sítios frágeis mais importantes do genoma humano, o FRA3B, e, portanto, alterações no gene *ATR* podem estar relacionadas com maior freqüência de alterações no gene *FHIT*. Tendo em vista a importância da inativação de *FHIT* para a progressão do câncer de mama e o fato de existirem poucas informações sobre o status deste gene em pacientes brasileiras, neste trabalho nós avaliamos alterações moleculares dos genes *FHIT* e *ATR* por técnicas de PCR e analisamos a expressão da proteína Fhit por imunohistoquímica.

Foram obtidas amostras de sangue periférico e de tecido mamário (proveniente de biópsia ou cirurgia) de 26 mulheres diagnosticadas com câncer de mama e de 16 mulheres com alterações mamárias benignas, as quais formaram o grupo controle. As amostras de DNA de ambos os tecidos foram analisadas por PCR utilizando iniciadores que amplificam quatro marcadores microssatélites localizados dentro do gene *FHIT* e três marcadores localizados dentro do gene *ATR*. A análise da perda de heterozigose (LOH) foi realizada através da comparação da presença e da intensidade dos alelos entre as amostras de DNA do tecido sangüíneo e do tecido mamário de cada paciente.

A LOH no gene *FHIT* ocorreu em 59% das pacientes com câncer de mama e em 30% das pacientes com alterações mamárias benignas, o que sugere que alterações no gene *FHIT* ocorrem precocemente no processo de carcinogênese mamária. As alterações no locus do gene *FHIT* ocorreram com maior freqüência nas proximidades da região codificadora do gene, principalmente próximo ao éxon 5, região onde está presente o sítio frágil FRA3B e próximo ao éxon 8, onde está localizado a tríade de histidina. Não foi observada correlação entre expressão dos marcadores tumorais RE, RP e MIB-1 e a LOH no gene *FHIT*. Destaca-se a associação entre o término do período fértil e LOH no gene *FHIT*, dado não demonstrado anteriormente na literatura. Diferentemente de outros trabalhos, as alterações no gene *FHIT* não alteraram a expressão da proteína Fhit, porém não foi determinado se essa proteína encontra-se em sua forma ativa.

A LOH no gene *ATR* ocorreu em 18,2% das pacientes com câncer de mama e em 15,4% das pacientes com alterações mamárias benignas. Entretanto, 60% das pacientes com LOH em *ATR* também apresentaram LOH em *FHIT*, o que sugere que alterações em *ATR* podem levar a alterações no gene *FHIT*. Estudos subsequentes, com um número maior de pacientes com alterações nesses genes, serão necessários para confirmar esses resultados.

Palavras-chave: Câncer de mama. FHIT. ATR.

8.1. ABSTRACT

FHIT is a tumor suppressor gene involved in the regulation of apoptosis and cell proliferation which is usually inactivated in many tumor types. In breast cancer cases, the loss or reduction of Fhit protein expression was associated with tumor progression and poor prognosis of the disease. Recently, it has been demonstrated that the kinase ATR plays an important role in the cell cycle *checkpoint* and it is critical to regulating fragile site stability, thus the inactivation of this gene results in fragile site instability. *FHIT* gene spans one of the most important fragile sites of the human genome, FRA3B, and, therefore, *ATR* gene alterations may be correlated with higher frequency of *FHIT* gene alterations. Given the role of *FHIT* inactivation in breast cancer progression and the fact that there is little information about the status of this gene in Brazilian patients, this study is aimed at evaluating molecular changes in *FHIT* and *ATR* genes by PCR methods, and investigating Fhit protein expression by immunohistochemistry.

Peripheral blood and breast tissue biopsy or surgical samples of 26 women diagnosed with breast cancer and 16 women with benign breast conditions, which comprised the control group, were collected. PCR was used to analyze the DNA samples of both tissues by using primers that amplify four microsatellite markers located within the *FHIT* gene and three markers located within the *ATR* gene. Loss of heterozygosity (LOH) analysis was performed by the comparison of the presence and intensity of alleles between the DNA blood sample and breast tissue sample of each patient.

LOH at the *FHIT* gene occurred in 59% of the patients with breast cancer and in 30% of the patients with benign breast conditions, suggesting that *FHIT* gene alterations occur early during breast carcinogenesis. Alterations in the *FHIT* locus happened more frequently in the surroundings of the gene coding region, mainly flanking exon 5, where the fragile site FRA3B is located, and flanking exon 8, where the histidine triad is present. No correlation between the expression of the tumor markers ER, PR and MIB-1 and the LOH at the *FHIT* gene was observed. The connection between the end of the fertile period and LOH at the *FHIT* gene, information that had not yet been demonstrated in the literature, is remarkable. Furthermore, unlike other studies, *FHIT* gene alterations did not alter Fhit protein expression. On the other hand, it was not established whether this protein was in its active form.

For the *ATR* gene, 18.2% of the patients with breast cancer and 15.4% of the patients with benign breast conditions presented LOH. However, 60% of the patients with LOH at the *ATR* gene also presented LOH at the *FHIT* gene, what suggests that alterations in *ATR* might cause alterations in the *FHIT* gene. Subsequent studies comprising a larger number of patients with alterations on these genes are, therefore, necessary to support these outcomes.

Key-Words: Breast cancer. FHIT. ATR.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev**, v. 15, p. 2177-2196, 2001.

AHMADIAN, M.; WISTUBA, I. I.; FONG, K. M.; BEHRENS, C.; KODAGODA, D. R.; SABOORIAN, M. H.; SHAY, J.; TOMLINSON, G. E.; BLUM, J.; MINNA, J. D.; GAZDAR, A. F. Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer Res.**, v. 57, p. 3664–3668, 1997.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast **Cancer – Facts & Figures 2003-2004**. American Cancer Society, Inc. 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast **Cancer Facts e Figures 2005-2006**. American Cancer Society, Inc. 2005

ANDRADE, J. C. Estudo Anátomo Clínico do Carcinoma de Paget da Mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 23, n. 1, p. 57, 2001.

ANDRIOLO A. Marcadores tumorais. **Rev Bras Méd**, v.53, p. 641-653, 1996.

BARNES, L. D.; GARRISON, P. N.; SIPRASHVILI, Z.; GURANOWSKI, A.; ROBINSON, A. K.; INGRAM, S. W.; CROCE, C. M.; OHTA, M.; HUEBNER, K. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5-P1,P3-triphosphate hydrolase. **Biochemistry**, v.35, p.11529–11536, 1996.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H. **Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. Projeto diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 1 ed. São Paulo: AMB-CFM, 2001.

BASSAM, B. J.; ANOLLÉS, G. C. E.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 196, p. 80-83, 1991.

BAYLIN, S.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, p.686–692, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de mama**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/mama>. Acesso em 12 de outubro de 2006.

BRENNER, C.; PACE, H. C.; GARRISON, P. N.; ROBINSON, A. K.; ROSLER, A.; LIU, X. H.; BLACKBURN, G. M.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K.; BARNES, L. D. Purification and crystallization of complexes modeling the active state of the fragile histidine triad protein. **Protein Eng**, v.10, n.12, p. 1461-1463, 1997.

BOHR, V. A. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. **Carcinogenesis**, v.16, p. 2885-2892, 1995.

BROWN, E.J.; BALTIMORE, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. **Genes Dev** v.17, p. 615–628, 2003.

BUELL, P. Changing incidence of breast cancer in japanese-American wowsen. **J Natl Cancer Inst.**, v. 51, p.1479, 1973.

CAMPIGLIO, M.; PEKARSKY, Y.; MENARD, S.; TAGLIABUE, E.; PILOTTI, S.; CROCE, C. M. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. **Cancer Res.**, v. 59, n. 15, p. 3866-3869, 1999.

CASPER, A. M.; NGHIEM, P.; ARLT, M. F.; GLOVER, T. W. ATR regulates fragile sites stability. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 779-789, 2002.

CHAGAS, C. R. Câncer de mama: Etiologia, fatores de risco e estadiamento. In: Oliveira, H. C. **Tratado de Ginecologia**. Ed. Revinter, p.947-967, 2001.

CHAUDHURI, A. R.; KHAN, I. A.; PRASAD, V.; ROBINSON, A. K.; RICHARD, F.; LUDUEN, R. F.; BARNES, L. D. The Tumor Suppressor Protein Fhit: a novel interaction with tubulin. **J Biol Chem**, v. 274, n. 34, p. 24378–24382, 1999.

COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J. Family history, age, and risk of breast cancer. **JAMA**, v. 270: p.338-343, 1993.

CROCE, C. M.; SOZZI, G.; HUEBNER, K. Role of FHIT in Human Cancer. **J Clin Oncol**, v.17, n. 5, p. 1618-1624, 1999.

CUI, J.; ANTONIOU, A. C.; DITE, G. S.; SOUTHEY, M. C.; VENTER, D. J.; EASTON, D. F.; GILES, G. G.; MCCREDIE, M. R. E.; HOPPER J. L. After BRCA1 and BRCA2 — what next? Multifactorial segregation analyses of three-generation, population-based australian families affected by female breast cancer. **Am J Hum Genet**, v. 68, p. 420–431, 2001.

DICKSON, R. B.; LIPPMAN, M. E. Growth factors in breast cancer. **Endocr Rev**, v. 16, p. 559-595, 1995.

DRAPER L. Breast cancer: trends, risks, treatments, and effects. **AAOHN J.**, v.54, n.10, p. 445-451, 2006.

DRUCK, T.; HADACZEK, P.; FU, T. B.; OHTA, M.; SIPRASHVILI, Z.; BAFFA, R.; NEGRINI, M.; KASTURY, K.; VERONESE, M. L.; ROSEN, D.; ROTHSTEIN, J.; MCCUE, P.; COTTICELLI, M. G.; INOUE, H.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. **Cancer Res.**, v. 57, n. 3, p. 504-512, 1997.

DUMON, K. R.; ISHII, H.; FONG, L. Y. Y.; ZANESI, N.; FIDANZA, V.; MANCINI, R.; VECCHIONE, A.; BAFFA, R.; TRAPASSO, F.; DURING, M. J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. **Proc. Natl. Acad.**, v. 98, p. 3346–3351, 2001.

EASTON, D.F. Familiar risks of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 4, n. 5, p.179-81, 2002.

EISENBERG, A. L. M.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Rev Bras Cancerol*, v. 47, n.4, p. 377-388, 2001.

FALZONI, R. Câncer de mama: história natural e anatomia patológica. In: HALBE, H. W. **Tratado de Ginecologia**. Editora Rocca, 3 ed, v.3, p. 2019-2022, 200

FANG, Y.; TSAO, C. C. ; GOODMAN, B. K. ; FURUMAI, R.; TIRADO, C. A.; ABRAHAM, R. T.; WANG, X.F. ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background. **EMBO J.**, v.23, p. 3164-3174, 2004.

FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; RUBY, S. G.; O'MALLEY, F.; SIMPSON, J.F.; CONNOLLY, J. L.; HAYES, D. F.; EDGE, S. B.; LICHTER, A.; SCHNITT, S. J. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, p. 966-978, 2000.

FONG, L.Y.; FIDANZA, V.; ZANESI, N.; LOCK, L. F.; SIRACUSA, L.D.; MANCINI, R.; SIPRASHVILI, Z.; OTTEY, M.; MARTIN, S. E.; DRUCK, T.; MCCUE, P.A.; CROCE, C. M.;HUEBNER, K. Muir-Torre-like syndrome in Fhit deficient mice. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 97, p. 4742-4747, 2000.

FORD, D.; EASTON, D. F.; STRATTON, M.; NAROD, S.; GOLDFAR, D.; DEVILEE, P.; BISHOP, D. T.; WEBER, B.; LENOIR, G.; CHANG-CLAUDE, J.; SOBOL, H.; TEARE, M. D.; STRUEWING, J.; ARASON, A.; SCHERNECK, S.; PETO, J.; REBBECK, T. R.; TONIN, P.; NEUHAUSEN, S.; BARKARDOTTIR, R.; EYFJORD, J.; LYNCH, H.; PONDER, B. A. J.; GAYTHER, S. A.; BIRCH, J. M.; LINDBLOM, A.; STOPPA-LYONNET, D.; BIGNON, Y.; BORG, A.; HAMANN, N. HAITES, R. J. SCOTT, C. M. MAUGARD, H. VASEN, U.; SEITZ, S.; CANNON-ALBRIGHT, L. A.; SCHOFIELD, A.; ZELADA-HEDMAN, M. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. **Am J Hum Genet.**, v. 62, p. 676–689, 1998.

FRIEDENREICH, C. M.; COURNEYA, K. S.; BRYANT, H. E. Summary Report: review of lifestyle and environmental risk factors for breast cancer. **Canadian Breast Cancer Initiative**, 2001.

GATALICA, Z.; LELE, S. M.; RAMPY, B. A.; NORRIS, B. A. The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1378-1383, 2000.

GINESTIER, C.; BARDOU, V. J.; POPOVICI, C.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; BERTUCCI, F.; GENEIX, J.; ADELAIDE, J.; CHAFFANET, M.; HASSOUN, J.; VIENS, P.; JACQUEMIER, J.; BIRNBAUM, D. Loss of FHIT protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer. **Int J Cancer**, v.107, n. 5, p. 854-862, 2003.

GLOVER, T. W.; STEIN, C. K. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 43, p. 265–273, 1988.

GRAM, I. I.; FRUNKHOUSER, E.; NORDGARD, L.; TABAR, L.; URSIN, G. Oral contraceptive use and mammografic patterns. **Eur J Cancer Prev.**, v. 11. n. 3, p. 265-270, 2002.

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. **Oncologist.**, v.11, n.5, p.435-449, 2006.

HAYASHI, S. I.; TANIMOTO, K.; HAJIRO-NAKANISHI, K.; TSUCHIYA, E.; KUROSUMI, M.; HIGASHI, Y.; IMAI, K.; SUGA, K.; NAKACHI, K. Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1981–1985, 1997.

HORTOBAGYI, G. N. Current status of adjuvant systemic therapy for primary breast cancer: progress and controversy. **CA Cancer J Clin** v. 45, p. 199-226, 1995.

HUEBNER, K.; GARRISON, P. N.; BARNES, L. D.; CROCE, C. M. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. **Annu. Rev. Genet.**, v.32, p. 07–31, 1998.

HUIPING, C.; AGNORSON, B. A. Analysis of the fragile histidine triad (FHIT) in lobular breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1552-1557, 2000.

HULKA, B. S., MOORMAN, P. G. Breast cancer hormones and other risk factors. **Maturitas**, v.38, n.1, p.103-113, 2001.

INCA. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

INGVARGSSON, S. FHIT alteration in breast cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 11, n. 5, p. 361-366, 2001.

INGVARSSON, S.; SIGBJORNSDOTTIR, B. I.; HUIPING, C.; JONASSON, J. G.; AGNARSSON, B. A. Alterations of the FHIT gene in breast cancer: association with tumor progression and patient survival. **Cancer Detect. Prev.**, v. 25, p. 292-298, 2001.

ISHII, H.; DUMON, K. R.; VECCHIONE, A.; FONG, L. Y. Y.; BAFFA, R.; HUEBNER; CROCE, C. M. Potential Cancer Therapy With the Fragile Histidine Triad Gene. Review of the Preclinical Studies **JAMA**, v. 286, n. 19, p. 2441- 2449, 2001.

JEZIORSKI, A.; BLONSKI, J.Z.; NIEWIADOMSKA, H. The expression of products of oncogens c-erbB2 and EGFR and proliferating antigens Ki67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. **J Exp Clin Cancer Res.**, v.19, p.61-67, 2000.

JIRICNY, J.; NYSTROM-LAHTI, M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v.10, p. 157-161, 2000.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet**, v. 27, p. 247-254, 2001.

KAWAKI, J.; MIYAZAKI, M.; ITO, H.; NAKAGAWA, K.; SHIMIZU, H.; YOSHIDOME, H.; UZAWA, K.; TANZAWA, H.; NAKAJIMA, N. Allelic loss in human intrahepatic cholangiocarcinoma: correlation between chromosome 8p22 and tumor progression. **Int. J. Cancer**, v. 88, n. 2, p. 228-231, 2000.

KNUDSON, A. G. Anticogenes and human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 10914-10921, 1993.

LEONG, A. S. Y.; LEE, A. K. C. Biological indices in the assessment of breast cancer. **J Clin Pathol: Clin Mol Pathol**, v. 48, p. 221-238, 1995.

MACGROGAN, G.; SOUBEYRAN, I.; DE MASCAREL, I. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in breast invasive ductal carcinomas: a correlative study of 942 cases. **Appl Immunohistochem**, v. 4, p. 219-227, 1996.

MAN, S.; ELLIS, I. O.; SIBBERING, M.; BLAMEY, R. W.; BROOK, J. D. High levels of allele loss at the FHIT and ATM genes in non-comedo ductal carcinoma in situ and grade I tubular invasive breast cancers. **Cancer Res**, v. 56, p. 5484–5489, 1996.

MOLINA, R.; BARAK, V.; DALEN, A. V. DUFFY, M. J.; EINARSSON, R.; GION, M.; GOIKE, H.; LAMERZ, R.; NAP, M.; SOLETORMOS, G.; STIEBER, P. Tumor Markers in Breast Cancer – European Group on Tumor markers recommendations. **Tumor Biol**, v. 26, p. 281–293, 2005.

MOTOYAMA, N.; NAKA, K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. **Curr Opin Genet Dev**. v.14, n. 1, p. 11-16, 2004.

MORAES, A. B.; ZANINII, R. R.; TURCHIELLOI, M. S.; RIBOLDIII, J.; MEDEIROSII, L. R. Survival study of breast cancer patients treated at the hospital of the Federal University in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2219-2228, 2006.

NATHANSON, K. L.; WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast cancer genetics: what we know and what we need. **Nat Med**, v. 7, p.552-556, 2001.

NEGRINI, M.; MONACO, C.; VORECHOVSKY, I.; OHTA, M.; DRUCK, T.; BAFFA, R.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. **Cancer Res.**, v.56, p.3173-3179, 1996.

OHTA, M.; INOUE, H.; COTTICELLI, M. G.; KASTURY, K.; BAFFA, R.; PALAZZO, J.; SIPRASHVILI, Z.; MCCUE, M. M.; DRUCK, T.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, v. 84, p. 587–597, 1996.

PEETERS, P. H. M.; VERBEEK, P. H. M.; KROL, A.; MATTHYSSEN, M. M. M.; WAARD, F. Age at menarche and breast cancer risk in nulliparous women. **Breast Cancer Res. Treat.** v. 33, p. 55-61, 1994.

PEKARSKY, Y.; ZANESI, N.; PALAMARCHUK, A.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. **The Lancet Oncology** v. 3, p.748-754, 2002.

PEKARSKY, Y.; GARRISON, P. N.; PALAMARCHUK, A.; ZANESI, N.; RAMI, I.; AQEILAN, R. I.; HUEBNER, K.; BARNES, L. D.; CROCE, C. M. FHIT is a physiological target of the protein KINASE SRC. **PNAS**, v. 101, n. 11, p. 3775-3779, 2004.

PINOTTI, J. A.; TEIXEIRA, L. C. Câncer de mama: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: HALBE, H. W. **Tratado de Ginecologia**. Editora Rocca, 3 ed, v.3, p. 2019-2022, 2000

MORI, M.; MIMORI, K.; SHIRAISHI, T.; ALDER, H.; INOUE, H.; TANAKA, Y.; SUGIMACHI, K.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Altered expression of Fhit in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. **Cancer Res.**, v. 60, n. 5, p.1177-1182, 2000.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.; Hrsg. (1989). **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

SANTOS, M. C. **Estudo da fase crônica de infecção e reinfecção por *Trypanossoma cruzi* no hamster: avaliação e caracterização da cepa VIC por métodos parasitológicos, anatopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular**. 2000. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2000.

SANTOS, S. C. L.; CAVALLI, L. R.; CAVALLI, I. J.; LIMA, R. S.; HADDAD, B. R.; RIBEIRO, E. M. S. F. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and FHIT genes in patients with sporadic breast cancer from Southern Brazil. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, p. 374-377, 2004.

SARD, L.; ACCORNERO, P.; TORNIELLI, S.; DOMENICO D.; BUNONE, G.; CAMPIGLIO, M.; COLOMBO, M. P.; GRAMEGNA, M.; CROCE, C. M.; PIEROTTI, M.A.; SOZZI, G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. **PNAS** v. 96, p. 8489–8492, 1999.

SEVIGNANI, C.; CALIN, G. A.; CESARI, R.; SARTI, M.; ISHII, H.; YENDAMURI, S.; VECCHIONE, A.; TRAPASSO, F.; CROCE, C. M. Restoration of Fragile Histidine Triad (FHIT) Expression Induces Apoptosis and Suppresses tumorigenicity in breast cancer cells lines. **Cancer Research**, v. 63, n. 6, p.1183–1187, 2003.

SHI, Y.; ZOU, M.; FARID, N. R.; PATERSON, M. C. Association of FHIT (fragile histidine triad), a candidate tumour suppressor gene, with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. **Biochem. J.**, v. 352, p. 443-448, 2000.

SHIMIZU, C.; FUKUTOMI, T.; TSUDA, H. C-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. **J Surg Oncol.**, v. 73, p. 17-20, 2000.

SIPRASHVILI, Z.; SOZZI, G.; BARNES, L. D.; MCCUE, P.; ROBINSON, A. K.; ERYOMIN, V.; SARD, L.; TAGLIABUE, E.; GRECO, A.; FUSETTI, L.; SCHWARTZ, G.; PIEROTTI, M. A.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K. Replacement of FHIT in cancer cells suppresses tumorigenicity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 57, p. 3664-3668, 1997.

SMIGAL, C.; JEMAL, A.; WARD, E.; COKKINIDES, V.; SMITH, R.; HOWE, H. L.; THUN, M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. **CA Cancer J Clin**, v.56, n.3, p.168-183, 2006.

SOZZI, G.; PASTORINO, U.; MOIRAGHI, L.; TAGLIABUE, E.; PEZZELLA, F.; GHIRELLI, C.; TORNIELLI, S.; SARD, L.; HUEBNER, K.; PIEROTTI, M. A.; CROCE, C. M.; PILOTTI, S. Loss of FHIT function in lung cancer and pre-invasive bronchial lesions. **Cancer Res.**, v.58, n. 22, p. 5032-5037, 1998.

TOMKA, M.; SEDLAKOVA, O.; REINEROVA, M.; VESELOVSKA, Z.; STEVURKOVA, V.; BARTOSOVA, Z.; ZAJAC, V. Mutation screening of the BRCA1 gene in Slovak patients. **Neoplasma**, v. 48, n. 6, p. 451-455, 2001.

UMEMURA, S.; KUROSUMI, M.; MORIYA, T.; OYAMA, T.; ARIHIRO, K.; YAMASHITA, H.; UMEKITA, Y.; KOMOIKE, Y.; SHIMIZU, C.; FUKUSHIMA, H.; KAJIWARA, H.; AKIYAMA, F. Immunohistochemical Evaluation for Hormone Receptors in Breast Cancer: A Practically Useful Evaluation System and Handling Protocol. **Breast Cancer**, v.13, p. 232-235, 2006.

VÁZQUEZ, T.; KRYGIER, G.; BARRIOS, E.; CATALDI, S.; VÁZQUEZ, A.; ALONSO, R. Análisis de sobrevivencia de una población con cáncer de mama y su relación con factores pronósticos: estudio de 1.311 pacientes seguidas durante 230 meses. **Rev Med Urug**, v.21, p.107-121, 2005.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **Cancer J Clin**, v. 50, n. 3, p. 156-170, 2000.

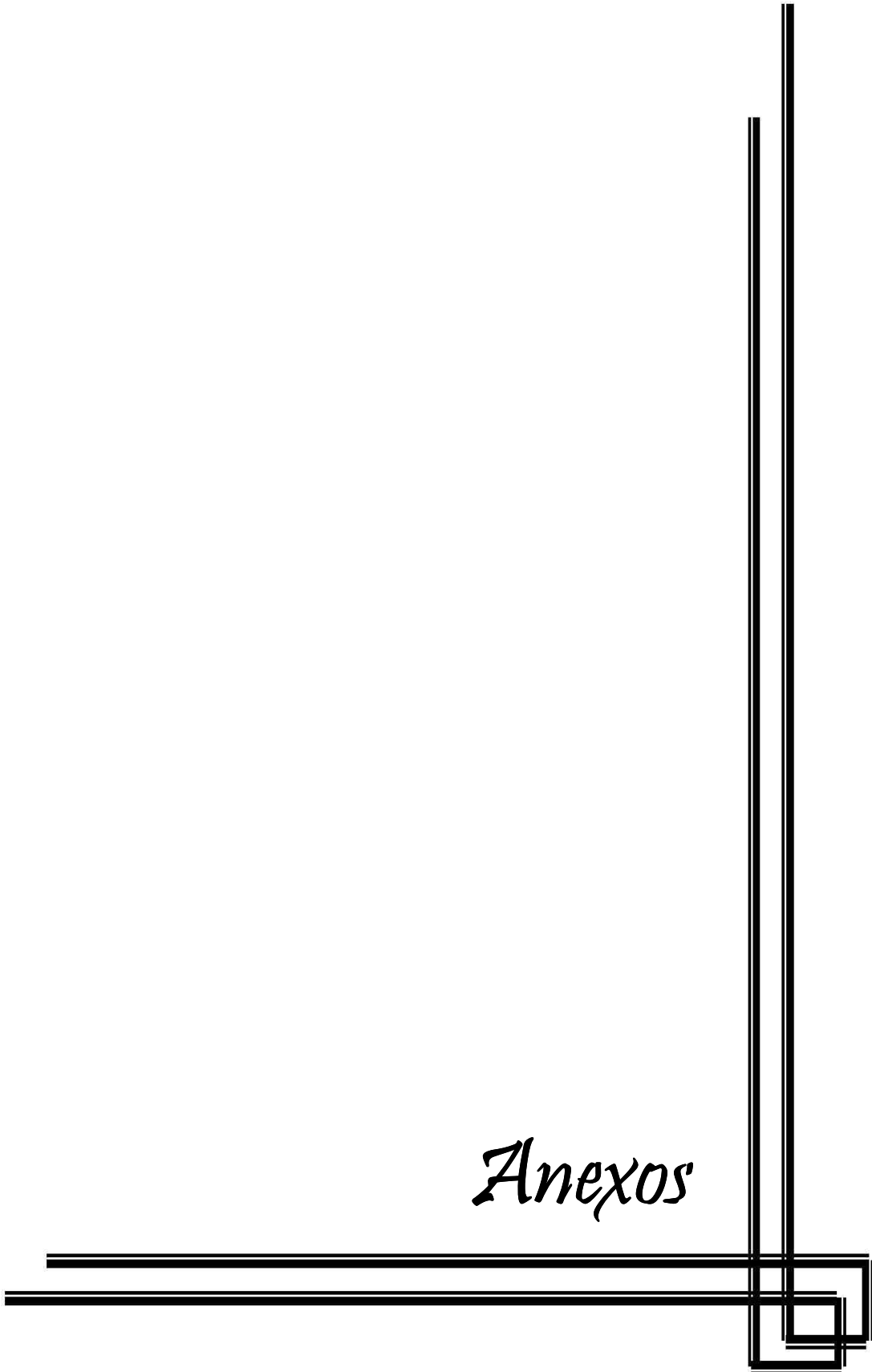
YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SUZUMA, T.; TAMAKI, T.; UMEMURA, T.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, Y.; WANG, X.; MORI, I.; SAKURAI, T.; KAKUDO, K. Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription protein expression in breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3869–3873, 2001.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, T.; KAKUDO, K. The Fragile Histidine Triad gene and breast cancer. **Med. Sci. Monit.**, v. 8, n. 7, p. 140-144, 2002.

YANG, J.; XU, Z.P.; HUANG, Y.; HAMRICK, H. R.; DUERKSEN-HUGHES, P. J.; YU, Y. N. ATM and ATR: Sensing DNA damage. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 2, p. 155-160, 2004.

ZOCHBAUER-MULLER, S.; FONG, K. M.; MAITRA, A.; LAM, S.; GERADTS, J.; ASHFAQ, R.; VIRMANI, A. K.; MILCHGRU, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. 5'CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3581–3585, 2001.

Anexos



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TÍTULO DO PROJETO: ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *FHIT* (*FRAGILE HISTIDINE TRIAD*) E *ATR* (*ATAXIA-TELANGIECTASIA AND RAD3 RELATED*) EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. ANDRÉ LUIZ PEDROSA

Prezada doadora,

Gostaria de convidá-la para participar de um estudo científico, cujo nome é “Análise molecular dos genes *FHIT* (*fragile histidine triad*) e *ATR* (*ataxia-telangiectasia and rad3 related*) em pacientes com câncer de mama”. O objetivo deste estudo é verificar se dois genes importantes, o gene *FHIT* e o gene *ATR*, podem ter sido perdidos durante o desenvolvimento de lesões na mama. A perda destes genes pode ser importante para o desenvolvimento de tumores, mas, para verificar isso, precisamos realizar pesquisas como esta. O estudo consiste em analisar fragmentos de tecidos de mama com suspeitas de alterações patológicas (ou seja, relacionadas com doença) e de fragmentos de tecidos que não tenham suspeita de lesões, o que provavelmente, é o caso das mulheres que fazem cirurgia de redução de mama. Esta pesquisa não lhe trará nenhum benefício diretamente, mas os avanços na área da saúde só acontecem se pesquisas como esta forem feitas, por isso sua participação é muito importante.

Caso você concorde em participar, gostaria de esclarecer que não será realizado nenhum procedimento que traga risco para a sua saúde. A coleta do material para a biópsia vai ser feita mesmo que você não participe desta pesquisa. Para a sua participação, você precisaria autorizar que um pequeno pedaço do material que será colhido para a biópsia seja destinado para esta pesquisa. Portanto, você não terá que passar por nenhum procedimento além do que você será submetida. Além deste material, nós também precisaríamos colher um pouco de sangue do seu braço, e aí você teria o desconforto de

uma picada de agulha. A coleta de sangue vai ser feita por um profissional com prática e com material descartável.

Gostaria de esclarecer que, se você aceitar colaborar com esta pesquisa, você terá direito a todas as informações relacionadas ao projeto e seu nome nunca será divulgado, já que você será identificada com um número. É importante também você saber que não é obrigada a participar deste estudo e que pode retirar o seu consentimento no momento que desejar, sem que o seu atendimento seja prejudicado. Você não receberá nenhum valor em dinheiro pela sua participação, mas também estará livre de qualquer responsabilidade sobre as despesas deste projeto.

Uberaba,//.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5434.

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

Análise dos Prontuários

Paciente número: _____ Data: ____/____/____

☐ Cirurgia mama: ____/____/____ ☐ QT ☐ Biópsia ____/____/____

Tecido : ☐ parafinado ☐ congelado

Diagnóstico: _____

Tamanho tumoral: _____ Comprometimento linfonodos: _____

Nome: _____

RG: _____ Cor: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos

Procedência: _____

Profissão: _____

Bebida: ☐ Sim ☐ Não Quanto tempo: _____

Fumo: ☐ Sim ☐ Não Quanto tempo: _____

Drogas: _____

Menarca: _____

Menopausa: _____

Filhos: _____ 1º parto: _____

Aborto: ☐ Sim ☐ Não Quantos: _____

Anticoncepcional: ☐ Sim ☐ Não Tempo: _____

Uso de algum remédio: (hormônio)

Histórico familiar CA mama:

Outro câncer: _____

Outra cirurgia (útero e ovário)

Outras Doenças:

Rosiley Aparecida de Souza Rabelo