

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO EM
MULHERES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA**

PÂMELA AVEIRO RESENDE

Uberaba-MG
2007

PÂMELA AVEIRO RESENDE

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO EM
MULHERES PORTADORAS DE 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 a obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a.Dr^a. Francisca da Luz Dias
COORIENTADOR: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Uberaba-MG
Agosto / 2007

Catálogo – na – fonte: Biblioteca da UFTM

R341a Resende, Pâmela Aveiro.
Avaliação citogenética da resposta ao tratamento quimioterápico em mulheres portadoras de câncer de mama / Pâmela Aveiro Resende. - - 2007.
84 f. : tab. ; fig.

Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Clínica” - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Francisca da Luz Dias.

1. Neoplasias mamárias. 2. Aberrações Cromossômicas. 3. Quimioterapia. I. Título. II. Dias, Francisca da Luz.

NLM – WP870

Resumo

RESUMO

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais incidente em mulheres no mundo. Durante os estágios da carcinogênese ocorre acúmulo de mutações no DNA celular. O teste de aberrações cromossômicas (AC) em linfócitos do sangue periférico é uma avaliação sensível para detectar danos citogenéticos causados pela exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos que elevam o risco de desenvolvimento de câncer. O uso clínico de drogas quimioterápicas pode aumentar a frequência de AC e contribuir para uma segunda neoplasia. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença de aberrações cromossômicas induzidas em linfócitos de sangue periférico em pacientes com câncer de mama, comparado ao grupo controle e, também, comparar a frequência de aberrações cromossômicas residuais após cada ciclo de quimioterapia entre as pacientes com câncer de mama. Foram avaliadas, de forma prospectiva, dez pacientes com diagnóstico de câncer de mama atendidas no Ambulatório de Mastologia da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da UFTM, submetidas ao tratamento quimioterápico neoadjuvante e um grupo de dez mulheres saudáveis. As pacientes receberam seis ciclos de quimioterapia e as amostras de sangue foram coletadas antes do tratamento e a cada ciclo, no dia da terapia. As metáfases foram obtidas a partir de linfócitos do sangue periférico após bloqueio com colchicina. A análise de 100 metáfases em microscópio de luz não mostrou aumento na frequência de AC, na frequência de células com AC e Índice mitótico (IM) entre o grupo controle e de pacientes antes da quimioterapia. Houve aumento no número de AC e células com AC no quarto ciclo de quimioterapia quando comparado ao grupo pré-quimioterapia. Ainda, houve significativo aumento do IM no terceiro ciclo comparado ao tempo pré-QT e primeiro ciclo, e no quinto ciclo quando comparado ao terceiro e quarto ciclos de quimioterapia. Assim, observou-se um aumento de AC até o quarto ciclo e uma diminuição no último ciclo a valores semelhante a pré-quimioterapia,

mostrando uma provável reparação dos danos pelas células. Em conjunto, os resultados sugerem que é indicada a avaliação do dano citogenético de linfócitos de pacientes com câncer de mama para estimar a sensibilidade ao tratamento quimioterápico, visto que a presença de aberrações cromossômicas estáveis pode aumentar o risco de uma neoplasia secundária.

Abstract

ABSTRACT

Breast cancer has been considered the second most frequent malignant neoplasia among women. During the carcinogenesis stages there are mutation accumulations in cell DNA. The test of chromosomal aberrations (CA) in lymphocytes of peripheral blood is sensitive for detection of cytogenetic damages caused by exposition to mutagenic and carcinogenic agents which are related to the increase of the risk of cancer development. The actual drugs used in cancer treatment are anti-proliferatives, which means, they work in cell blocking the processes of grow and division. The clinical use of drugs during the chemical therapy may increase the CA frequency contributing for a second neoplasia. This work aimed to evaluate the presence of chromosomal aberrations induced in lymphocytes of peripheral blood from patients with breast cancer in relation to a control group; as well as to compare among these patients the frequency of residual chromosomal aberrations after each chemical therapy cycle. Ten patients diagnosed with breast cancer in Mastology Clinic of Obstetrics and Gynecology Discipline of University Hospital of UFTM was treated with neoadjuvante chemotherapy and ten women without breast cancer diagnostic were evaluated. Patients were treated with six cycles of chemical therapy and the blood was sampled before starting the treatment and immediately before starting each cycle. Lymphocytes were cultured in medium of RPMI or Dubeccos' supplemented with Fetal Bovine Serum and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) per 72 h at 37° C. The metaphases were found after blocking with colchicine. By the light-microscopy analysis of 100 metaphases we found an increase in cell CA frequency and mitotic index (MI) between the control and the patients before chemical therapy. In relation to the pre-treatment period, there was an increase in number of CA and in CA cells among patients at forth treatment cycle. In relation to MI, there were statistic differences between third cycle and pretreatment period; and when the first and fifth cycles were compared to third and

fourth cycles. Thus, the increase of CA until the fourth cycle and the decrease in the last cycle should be happened as consequence of a putative cell repair mechanism. The evaluation of cytogenetic damage in lymphocytes of breast cancer patients is being indicated for estimating the sensitivity of the chemical therapy since the stable chromosomal aberrations may lead to the increase of a secondary neoplasia occurrence.

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características individuais das pacientes com câncer de mama.....	46
Tabela 2.	Dados das mulheres que constituíram o grupo controle.....	47
Tabela 3.	Descrição dos tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases de pacientes com câncer de mama e no grupo controle.....	49
Tabela 4.	Número de aberrações cromossômicas no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.....	50
Tabela 5.	Número de aberrações cromossômicas no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.....	51
Tabela 6.	Resultados estatísticos das análises do total de aberrações cromossômicas/100 pelo teste t- Student pareado.....	52
Tabela 7.	Número de células com aberrações cromossômicas/100 células no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.....	53
Tabela 8.	Número de células com aberrações cromossômicas/100 células no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.....	54
Tabela 9.	Resultados estatísticos das análises de células com aberrações cromossômicas/100 células pelo teste t- Student pareado.....	55
Tabela 10.	Medidas descritivas do Índice Mitótico (%) no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.....	56
Tabela 11.	Medidas descritivas do Índice Mitótico (%) no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.....	57
Tabela 12.	Resultados estatísticos das análises de Índice Mitótico (%) pelo teste t- Student pareado.....	58

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição de pacientes com câncer de mama (n=10) de acordo com a faixa etária (<40 anos; 40-69 anos e >69 anos)..... 47

*Lista de Abreviaturas e
Síglas*

SIGLAS E ABREVIATURAS

A.....	Adriamicina
AC.....	Aberração cromossômica
AJCC.....	American Joint Committee on Cancer
<i>BRCA 1</i>	Breast cancer gene 1
<i>BRCA 2</i>	Breast cancer gene 2
B.....	Branca
C.....	Ciclofosfamida
Cx.....	Controle
CAC.....	Células com Aberrações Cromossômicas
D.....	Direita
DP.....	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.....	Esquerda
Epi.....	Epirubicina
F.....	5-fluoracil
g.....	Gramas
h	Horas
HE.....	Hospital-Escola
IM.....	Índice Mitótico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCl.....	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
µL	Microlitro (10 ⁻⁶ litro)
M.....	Metotrexato

M	Molar
Min.....	minutos
mL.....	Mililitro (10^{-3} litro)
MN	Micronúcleos
n	Número de indivíduos
N.....	Negra
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de dissódico
P.....	Paciente
PBAAF.....	Punção para Biópsia Aspirativa por Agulha Fina
Pré-QT.....	Antes da quimioterapia
rpm	Rotações por minutos
RPMI 1640	Meio de cultura
TAC.....	Total de Aberrações de Cromossômicas
TCI	Troca de cromátides irmãs
TNM	Tamanho do tumor (T), presença de nodo axilar (N) e/ou metástase (M)
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UI.....	Unidade internacional
UICC.....	<i>Committee of the International Union against Cancer</i>
VMAX	Valor máximo
VMIN	Valor mínimo
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
>	Maior que

Sumário

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	24
1.1 -	Câncer de mama.....	25
1.2 -	Alterações Genéticas no Câncer.....	27
1.3 -	Quimioterapia.....	31
1.4 -	Quimioterapia e Danos genéticos.....	32
2 -	OBJETIVOS.....	36
3 -	PACIENTES E MÉTODOS.....	38
3.1 -	Pacientes e Controles.....	39
3.2 -	Tratamento Quimioterápico.....	40
3.3 -	Coleta de Sangue.....	40
3.4 -	Cultura de Linfócitos.....	41
3.5 -	Análise Cromossômica.....	42
3.6 -	Análise Estatística.....	42
3.7 -	Preparo de Tampões, Soluções, Meios de Cultura, Reagentes.....	43
4 -	RESUTADOS.....	45
4.1 -	População de Estudo.....	46
4.2 -	Aberrações Cromossômicas.....	48
5 -	DISCUSSÃO.....	59
6 -	CONCLUSÃO.....	68
7 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8 -	ANEXOS.....	80

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

O câncer de mama se apresenta como a segunda neoplasia maligna mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo. É a maior causa de óbitos por câncer na população feminina, principalmente na faixa etária entre 40 e 69 anos, sendo relativamente raro antes dos 35 anos de idade. Na região Sudeste, o câncer de mama é o de maior incidência entre as mulheres, com um risco estimado de 71 novos casos para cada 100 mil mulheres. Um dos fatores que dificulta o tratamento é o diagnóstico da doença em estádios avançados. De acordo com o Ministério da Saúde, a maioria dos casos de câncer de mama, no Brasil, é diagnosticada em estádios avançados, diminuindo as chances de sobrevivência das pacientes e comprometendo os resultados do tratamento (INCA, 2007).

O câncer de mama é caracterizado por um curso clínico heterogêneo. Isto é devido a alguns aspectos relacionados a fatores de risco diferentes para o diagnóstico da doença como etnia, dieta, idade, fatores ambientais e exposição cumulativa ao estrogênio. A diversidade no curso clínico do câncer de mama está relacionada a diferenças no grau do tumor, invasão, potencial metastático e outras sinalizações complexas do crescimento celular e de sobrevivência (CHANG; HILSENBECK; FUQUA, 2005).

O câncer de mama pode ser classificado como uma doença complexa a nível genético. O fenótipo desta doença é resultado da interação de genes e fatores ambientais. Fatores de risco não genéticos incluem; idade da menarca, menopausa e nascimento do primeiro filho. Paridade e menopausa precoce parecem reduzir o risco, enquanto que a menarca precoce está associada ao aumento do risco de câncer de mama. Dieta gordurosa e

sedentarismo podem estar associados com risco moderado (BRODY; BIESECKER, 1998). Em algumas famílias, fatores herdados são o maior componente de risco individual de câncer. Mulheres com risco de câncer de mama podem diferir de acordo com a história familiar de câncer de mama/ovário e história pessoal de doença benigna de mama (HILL *et al.*, 2002). Porém, a maioria dos casos de câncer de mama é esporádica e apenas 10% é familiar, podendo ser devido a mutações na linha germinativa de alta penetrância ou mutações em um pequeno número de genes com risco elevado para o câncer de mama, tais como o *BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer gene 1* e *breast cancer gene 2*) (VENKITARAMAN, 2002).

Genes herdados em estado de mutação resultam em alto risco de câncer com forte história familiar. Estudos epidemiológicos mostram que 15-20% dos casos de câncer de mama familiar ocorrem em famílias que carregam uma forte predisposição a mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003). Câncer de mama bilateral, idade jovem e muitos indivíduos afetados na família com câncer de mama e/ou de ovário podem indicar predisposição a um único gene, tais como o *BRCA1* ou *BRCA2* (BRODY; BIESECKER, 1998; ROSEN *et al.*, 2003).

Há vários fatores prognósticos utilizados para o estadiamento do câncer de mama como o envolvimento de linfonodos axilares, tamanho do tumor, grau de diferenciação e subtipo histológico do tumor e grau nuclear. Estes fatores têm sido identificados para guiar o tratamento e predizer os resultados clínicos. O receptor de estrogênio e o de progesterona são biomarcadores utilizados para predizerem a resposta à terapia hormonal na doença metastática (CLARK, 2001). Alguns fatores considerados como preditivos de resposta ao tratamento têm sido utilizados na rotina clínica, como o receptor de estrogênio e de progesterona e HER-2/c-Erb-B2 (CHANG; HILSENBECK; FUQUA, 2005).

O rastreamento para o câncer de mama inclui a mamografia em um estágio precoce, mais frequentemente, exame clínico realizado pelo médico e auto-exame da mama. Opções de prevenção incluem estratégias de quimioprevenção bem como intervenções cirúrgicas. Cada um deles é usado dependendo do tipo e estadió do tumor, e podem ser usados isolados ou de forma concomitante.

1.2. Alterações Genéticas no Câncer

O genoma humano é constantemente agredido por metabólitos reativos endógenos, drogas terapêuticas e mutágenos ambientais que perturbam a sua integridade. Durante os estágios da carcinogênese ocorre acúmulo de mutações no DNA celular. O reparo do dano do DNA é essencial para a sobrevivência da célula e a saúde do organismo. A célula desenvolveu diversos mecanismos para lidar com uma grande variação de lesões no DNA. Então, a estabilidade do genoma deve estar em vigilância contínua. Isto é executado por mecanismos de reparo do DNA, que removem ou toleram lesões pré-citotóxicas, pré-mutagênicas e pré-clastogênicas do DNA (BOER, 2002).

Para assegurar integridade do genoma e suprimir mutações, as células utilizam mecanismos de checagens da replicação do DNA, que asseguram a fidelidade da replicação; supressão do estresse oxidativo resultante de processos metabólicos endógenos que levam à oxidação do DNA; regulação da progressão do ciclo celular, para assegurar o reparo do DNA; a duplicação e a segregação dos cromossomos, corrigindo todos os tipos de danos no DNA causados por processos endógenos ou agentes exógenos (DIXON; KOPRAS, 2004). O caminho mais importante inclui a excisão de base e de nucleotídeo, reparo do mau pareamento de base e a quebra de fita de DNA. Defeitos nesses mecanismos

de reparo resultam em aumento na frequência de mutações e aberrações cromossômicas (AC) (BOER, 2002).

Pessoas com deficiências nos mecanismos de reparo têm sensibilidade aumentada a agentes lesivos ao DNA, acumulando mutações no genoma, tais como os genes *BRCA1* e *BRCA2*, envolvidos na quebra de fita dupla e reparo da transcrição em câncer de mama, tendo como consequência o desenvolvimento de tipos de câncer espontâneos e induzidos (SCULLY; LIVINGSTON, 2000; BOER, 2002).

A importância do reparo do DNA pode ser ilustrada por deficiências e síndromes genômicas, caracterizadas pelo aumento de incidência de câncer e alterações metabólicas. Os genes de reparo do DNA e suas proteínas correspondentes, também, são responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a drogas citostáticas em células tumorais (CHRISTMANN *et al.*, 2003). A resposta da célula ao dano no DNA e a sua capacidade de manter a estabilidade genômica pelo reparo do DNA é, portanto, crucial à prevenção da iniciação e progressão do câncer (BLASIAK *et al.*, 2004).

O início e a progressão do câncer é um processo de muitas etapas e envolve o acúmulo de alterações genéticas nas células somáticas. Estas alterações podem ser iniciadas através de mutações que ativam a expressão de proto-oncogenes e inativam genes supressores de tumor, que regulam a proliferação celular. A alteração desses genes estimula a proliferação celular, levando à expansão da população de células transformadas e à redução da função de supressão do tumor (HAHN; WEINBERG, 2002). Uma exigência para o desenvolvimento do câncer é a imortalização celular. Células normais são capazes de sofrer apenas um número finito de divisões antes de atingirem o ponto crítico e morrerem. Este fenômeno tem sido atribuído ao encurtamento gradual de uma seqüência pequena do DNA no fim dos cromossomos, para proteger da degradação e fusão. A ausência de telômero leva à instabilidade genética e à apoptose (DIXON; KOPRAS, 2004).

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular através do qual as células que perderam as suas funções ou apresentaram defeitos são eliminadas do organismo, tendo importante papel na regulação do desenvolvimento, diferenciação e homeostase tecidual (CHINTAMANI *et al.*, 2004). As células tumorais vencem a instabilidade genética e a apoptose por ativar o gene da telomerase, o que resulta em divisão celular infinita (imortalização) (DIXON; KOPRAS, 2004). As células cancerosas possuem a capacidade de gerar seus próprios sinais mitogênicos, resistir a sinais inibidores de crescimentos, evadirem a apoptose, proliferar sem limites (imortalização), adquirir vascularização e invadir tecidos, em estágios mais avançados (HANH; WEINBERG, 2002).

A característica principal de quase todas as células cancerosas é a instabilidade genética (ROUSE; JACKSON, 2002). As AC observadas em células malignas podem acumular através da instabilidade genética e da seleção. A instabilidade genética denota uma proporção de mutações superior à observada em células normais e a seleção envolve apenas AC que propiciam a vantagem de sobrevivência e divisão celular. São causadas por algumas mutações herdadas, em genes que monitoram a integridade genômica, ou mutações que são adquiridas em células somáticas durante o desenvolvimento tumoral (GORRINGE *et al.*, 2005). A instabilidade cromossômica não é crucial apenas para o desenvolvimento tumoral, mas também desempenha um papel na resistência à quimioterapia (GISSELSSON, 2001). A instabilidade genômica pode ser detectada a nível citogenético por uma alta proporção de alterações espontâneas ou um aumento na sensibilidade a agentes mutagênicos e clastogênicos (HSU *et al.*, 1989).

A incapacidade de reparo do dano do DNA é propriedade intrínseca dos linfócitos de pacientes com câncer de mama e é, provavelmente, independente do agente causador do dano. O processo de transformação maligna das células da mama pode estar associado com a redução ou depleção da capacidade de células somáticas removerem o dano do seu DNA

(BLASIAK *et al.*, 2004). Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, os linfócitos tiveram mais radiosensibilidade que doadores normais, enquanto que linfócitos de sangue periférico de pacientes foram mais sensíveis que fibroblastos na detecção de alterações cromossômicas induzidas pela radioterapia (BORGSMANN *et al.*, 2002).

As alterações genéticas podem ocorrer em vários níveis, por exemplo: em um único nucleotídeo, em pequeno segmento de DNA (microssatélites), em genes inteiros, na estrutura dos cromossomos ou em cromossomo inteiro (BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003), levando às aberrações cromossômicas, rearranjos e aneuploidia (DIXON; KOPRAS, 2004).

As aberrações cromossômicas são conseqüências biológicas importantes de exposição humana a radiação ionizante e outros agentes genotóxicos. O teste de AC em linfócitos do sangue periférico é uma avaliação sensível para detectar danos citogenéticos causados pela exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, podendo elevar o risco de desenvolvimento de câncer (BONASSI *et al.*, 1995). As AC são eventos importantes no desenvolvimento tumoral pelo fato de que o ponto de quebra no cromossomo, em sítios específicos do DNA, pode às vezes coincidir com a localização de oncogenes nas células (YUNIS, 1983).

É relatada associação de AC em linfócitos de sangue periférico e risco de câncer. Esta relação baseia-se no conceito de que dano genético em linfócitos reflete danos semelhantes em células cancerosas. A demonstração do papel do dano cromossômico na causa do câncer é importante para o estudo de mecanismos da carcinogênese, bem como em saúde pública (BONASSI *et al.*, 2000). A análise de aberrações cromossômicas é considerada útil para estimar o comportamento biológico de cada caso de câncer (TANNER *et al.*, 1994), uma vez que o estudo dos cariótipos representa o passo inicial na

determinação de mudanças cromossômicas nas células (BERNADINI, WEBERPALS, SQUIRE, 2004).

1.3. Quimioterapia

A partir de 1974 teve início o tratamento combinado, quimioterapia primária (neoadjuvante) seguida de cirurgia e/ou radioterapia, para o câncer de mama em estádios avançados, que se tornou comum para pacientes com câncer de mama avançado localmente ou bordas inoperáveis (HORTOBAGYI *et al.*, 1988). Esse tipo de tratamento pode aumentar a sobrevida através da erradicação de micrometástases distantes e diminuir o tamanho do tumor, desta forma aumentando as cirurgias conservadoras (MORENO *et al.*, 2002; COCQUYT *et al.*, 2003). Outra vantagem de quimioterapia neoadjuvante, talvez a mais significativa, é que permite observar a resposta do tumor primário ao tratamento (CHINTAMANI *et al.*, 2004).

Os fármacos utilizados atualmente para o tratamento do câncer são antiproliferativos. Agentes quimioterápicos são drogas que agem na célula interferindo com o processo de crescimento e divisão. A maioria deles não tem especificidade para um tipo celular e não destroem células de forma seletiva e exclusiva; também, destroem células normais. Usualmente são tóxicos para os tipos de proliferações teciduais rápidas, caracterizadas por elevada atividade mitótica e ciclo celular curto (SILVA; TAKAHASHI; CARRARA, 2002). A proliferação rápida de células normais e tumorais é mais susceptível à ação de agentes quimioterápicos, explicando os efeitos e a toxicidade (CHITAMANI *et al.*, 2004).

1.4. Quimioterapia e Danos genéticos

A sensibilidade mutagênica é o aumento da resposta à ação do dano do DNA a mutágenos/carcinógenos e tem sido descrita repetidamente como um marcador potencial de susceptibilidade a câncer em humanos (TRENZ *et al.*, 2003).

O aumento da radiosensibilidade cromossômica é uma conseqüência de efeitos herdados na capacidade das células processarem os danos do DNA de origem endógena e exógena, do tipo induzido pela radiação ionizante, e foi relacionado à predisposição ao câncer (BARIA *et al.* 2001; BARIA *et al.* 2002). Aproximadamente 40% de pacientes com câncer de mama têm um aumento na sensibilidade dos danos cromossômicos causados por radiação ionizante, comparado a 5-10% em controles, sugerindo que mulheres com câncer de mama são deficientes no reparo de dano no DNA induzido por radiação (SCOTT *et al.*, 1999). Mulheres saudáveis com história familiar de câncer de mama (um parente afetado em primeiro grau ou dois afetados em segundo grau) apresentam sensibilidade mutagênica na fase G₂ do ciclo celular maior que aquelas sem história familiar. Ainda, casos de câncer de mama em mulheres com história familiar, à proporção de casos que são sensíveis em G₂, é maior que em mulheres sem história familiar (PARSHAD *et al.*, 1996).

Alguns mecanismos podem estar envolvidos na sensibilidade em G₀ e G₂ como defeitos no reparo do DNA e no controle dos pontos de checagem do ciclo celular, diferenças na estrutura da cromatina, influenciando a conversão do dano do DNA em quebras cromossômicas e na eliminação pré-mitótica de potenciais danos por apoptose. Ainda, um aumento da radiosensibilidade poderia predispor aos tumores maiores e mais agressivos (SCOTT *et al.* 1999).

Análises citogenéticas como as aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e troca de cromátides irmãs (TCI) tem sido freqüentemente utilizadas para

determinar nos cromossomos, os danos que ocorreram no DNA (TUCKER; PRESTON, 1996). Sensibilidade cromossômica à radiação e a mutágenos químicos foi proposta como um marcador de predisposição a genes de baixa penetrância para vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (BARIA *et al.*, 2001). Neste tipo de câncer foi observado aumento na sensibilidade aos danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos, quando comparado aos controles (SCOTT *et al.*, 1999; TRENZ *et al.*, 2003). A quantidade de indivíduos sensíveis a agentes mutagênicos foi maior que a porcentagem conhecida de indivíduos com uma forte predisposição causada por genes altamente penetrantes, tais como *BRCA1* e *BRCA2*. Portanto, foi sugerido que muitas pacientes com câncer de mama podem carregar mutações em genes de baixa penetrância, os quais podem estar envolvidos no processamento no dano do DNA (SCOTT *et al.*, 1999; BURRILL *et al.*, 2000).

Pacientes tratados com quimioterapia podem desenvolver uma variedade de efeitos colaterais, incluindo câncer secundário, porque seu DNA contém danos, capazes de alterar genes que são importantes em transformação neoplásica, incluindo proto-oncogenes e genes supressores de tumor (BLASIAK *et al.*, 2004).

Agentes alquilantes afetam o genoma de mamíferos formando lesões no DNA e causando mutações de substituição de base ou prevenindo a replicação. A ciclofosfamida é uma pró-droga alquilante que requer bioativação para o efeito danoso. Seus metabólitos ativos induzem aductos de DNA, quebra de fita simples, *crosslinks*, troca de cromátides irmãs e AC. O 5-fluoracil é uma pirimidina antagonista e é convertida no organismo a monofosfato de 5-flúor-2-desoxi-uridina, composto semelhante ao nucleotídeo, inibindo a síntese da fita de DNA. O metotrexato também é uma droga inibidora da síntese da fita de DNA. A doxorrubicina é uma antraciclina, cuja atividade antiproliferativa é baseada na capacidade de se difundir através da membrana celular e intercalar entre os pares de bases do DNA e alvo da topoisomerase II, causando quebra de fita dupla de DNA e gerando

radicais livres (CHITAMANI *et al.*, 2004; BISHOP; WITT; SLOANE, 1997). A maioria das drogas usadas no tratamento do câncer de mama interage com o DNA, desta forma o dano do DNA deve ser considerado como um efeito colateral da terapia (BLASIAK *et al.*, 2004).

Aberrações cromossômicas estáveis representam um biomarcador para malignidades secundárias. Alguns estudos afirmam que células de pacientes com síndrome de quebra cromossômica tais como Ataxia telangiectasia ou Anemia de Fanconi são sensíveis à radiação ionizante e a agentes alquilantes, sendo esses pacientes mais propensos a desenvolver malignidades (HEDDLE *et al.*, 1978; PATERSON; SMITH, 1979; HARNDEN, 1985).

O uso clínico de drogas quimioterápicas pode aumentar a frequência de AC, tanto em células neoplásicas como em células normais. Dessa forma, a população de células normais pode manter alterações cromossômicas estáveis e contribuir para uma segunda neoplasia. A maioria dos estudos tem avaliado AC em linfócitos de sangue periférico obtidos de pacientes antes e após radioterapia, existindo poucos estudos em relação à quimioterapia.

A **hipótese** deste trabalho é que mulheres com câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico apresentam aumento do número de aberrações cromossômicas, relacionado com os ciclos seqüenciais de quimioterapia.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Avaliar os danos citogenéticos induzidos em linfócitos do sangue periférico, através da técnica de aberrações cromossômicas, em pacientes com câncer de mama comparado a mulheres normais.
- Comparar a frequência de aberrações cromossômicas residuais nas pacientes com câncer de mama após tratamento quimioterápico, de acordo com os ciclos seqüenciais de quimioterapia.
- Analisar pela contagem de células em divisão se o tratamento quimioterápico está atuando sobre o ciclo celular dos linfócitos.

Pacientes e Métodos

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes e Controles

Foi realizado estudo prospectivo avaliando aleatoriamente 10 mulheres com diagnóstico de câncer de mama, que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante, sem qualquer tipo de tratamento antineoplásico anterior ou uso de drogas imunossupressoras, atendidas no Ambulatório de Mastologia da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O período de coleta das amostras foi de 2004 a 2006. O diagnóstico foi realizado através de exame clínico e mamográfico e confirmado através de Punção para Biópsia Aspirativa por Agulha Fina (PBAAF) e/ou “Core Biopsy”. O estadiamento anátomo-patológico seguiu a recomendação do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* juntamente com o *Committee of the International Union against Cancer (UICC)*. Tal procedimento reflete a extensão tumoral em TNM – tamanho do tumor (T), presença de nodo axilar (N) e/ou metástase (M) – e permite priorizar, a partir de então, o tratamento mais adequado (BEAHRs, 1984). Foram coletados dados dos prontuários das pacientes como idade, etnia, lado da mama atingida, drogas utilizadas no tratamento quimioterápico, tipo e estágio do tumor.

Os controles foram mulheres voluntárias sadias da comunidade, isto é, sem doença diagnosticada, sem uso de drogas imunossupressoras, abordadas quando da coleta do sangue. Os grupos controle e paciente foram pareados quanto à idade e tabagismo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (protocolo 536, **Anexo A**) e todas as pacientes que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo B**).

3.2. Tratamento Quimioterápico

As pacientes foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante, de acordo com a rotina do setor. O tratamento foi realizado em 6 ou 8 ciclos, com intervalo de 21 dias entre cada ciclo e contagem total de leucócitos maior ou igual a $2000/\text{mm}^3$, avaliada através de leucograma realizado, em média, 2-3 dias antes do início de cada ciclo. O tratamento quimioterápico foi constituído da combinação dos seguintes esquemas: (a) esquema AC: adriamicina ($50 \text{ mg}/\text{m}^2$) e ciclofosfamida ($500 \text{ mg}/\text{m}^2$), (b) CEpi: ciclofosfamida ($500 \text{ mg}/\text{m}^2$) e epirrubicina ($50 \text{ mg}/\text{m}^2$), (c) CMF: ciclofosfamida ($500 \text{ mg}/\text{m}^2$), metotrexato ($50 \text{ mg}/\text{m}^2$) e 5-fluoracil ($600 \text{ mg}/\text{m}^2$). Por ser o tratamento individualizado, a manutenção do mesmo por período maior ou menor do que o prescrito inicialmente foi dependente da resposta tumoral.

As amostras de sangue para a realização das culturas foram coletadas minutos antes do início de cada ciclo. Por razões como, a paciente ter recebido transfusões de sangue devido à baixa quantidade de leucócitos, dificuldade de punção de veias para a retirada das amostras de sangue e a própria debilidade da paciente frente ao tratamento, o sangue não foi coletado de todas as pacientes em todos os ciclos.

3.3. Coleta de Sangue

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas das pacientes por pessoas habilitadas, utilizando material descartável e esterilizado, seguindo todos os princípios de assepsia, em dois momentos distintos: (1) antes do tratamento instituído, ou seja, antes do 1º ciclo de quimioterapia quando a paciente ainda não havia recebido nenhum tipo de tratamento e, (2) cerca de 21 dias (período necessário para a recuperação da aplasia

medular induzida pela quimioterapia) após o término de cada ciclo, imediatamente antes do ciclo seguinte.

Em cada tempo foi coletada 1 amostra contendo 5 mL sangue, com anticoagulante (heparina, 100 UI/mL), utilizada para a cultura de linfócitos. Após a coleta, as amostras foram conservadas a 4°C por algumas horas até a realização das culturas.

O mesmo procedimento foi realizado para a coleta de sangue das voluntárias sadias, em um só momento.

3.4. Cultura de Linfócitos

Para a análise das aberrações cromossômicas, as metáfases foram obtidas segundo a técnica de Moorhead et al. (1960) modificada.

O sangue foi colocado em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO®) e/ou Dubeccos' (GIBCO®) e centrifugado (10 min, 1200 rpm) para a separação da camada leucocitária. Esta foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur e adicionada em cultura contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO®) e/ou Dubeccos' (GIBCO®), 3 mL de soro bovino fetal (GIBCO®), 0,3 mL de fitohemaglutinina (SIGMA®) e 0,1 mL de glutamina e incubada por 72 horas a 37°C. Foi adicionada às culturas colchicina (0,16%, 25µL), 60 minutos antes da colheita. De cada integrante da amostra foram feitas duas culturas.

Após 72 h de incubação, as culturas foram transferidas para tubos de centrífuga e após centrifugação (10 min, 1200 rpm) os sobrenadantes foram descartados. Em seguida foram adicionados 10 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl, 0,075 M), sendo o material ressuspensão nesta solução e deixado por 25 minutos à temperatura ambiente, antes de ser centrifugado. Foi realizada a fixação com 10 mL de solução de metanol e ácido acético (3:1), sendo o material homogeneizado e centrifugado. Esse

procedimento foi realizado três vezes. Na última fixação, foram deixados em torno de 0,5 mL de material para fazer as lâminas. Após a fixação, cerca de duas gotas do material foi colocada sobre um filme de água gelada em lâminas de microscopia limpas.

A coloração das lâminas foi feita com uma solução de Giemsa e tampão Sorënsen (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06 M; pH 6,8), na proporção de 25 μL de Giemsa para cada mL de tampão. As lâminas foram recobertas com essa solução e coradas por 4 minutos, após esse tempo foram lavadas em água corrente e deixadas para secar ao ar livre.

3.5. Análise Cromossômica

As metáfases foram analisadas em teste cego em microscópio de luz, usando-se a objetiva de imersão (objetiva de 100X e ocular 10X, com um aumento total de 1000X). Para a quantificação das aberrações cromossômicas foram analisadas 100 metáfases por indivíduo. Foram observadas alterações estruturais como *gaps*, quebras, fragmentos acêntricos, anéis, dicêntricos, trirradial, associações teloméricas e *exchanges*. Foram analisadas apenas metáfases com 46 ± 1 cromossomos, com bom espalhamento e sem sobreposição de cromossomos. As aberrações cromossômicas encontradas foram classificadas de acordo com as terminologias de Savage; Simpsom (1994); Savage (1997).

O Índice Mitótico foi determinado através da razão entre o número de metáfases encontradas em 1000 células, expresso em porcentagem.

3.6. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através do programa *Sigmastat 3.1* e *Statistica 6.0*. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade

das variâncias pelo teste de Levene. Sendo a distribuição normal, os resultados foram apresentados em médias e desvio padrão. Foi realizada análise ANOVA-F. Quando nesta análise não foi verificada interação significativa dos fatores utilizou-se o teste t-Student não pareado para as comparações entre controle e pacientes antes da quimioterapia, e pareado entre os grupos pré e pós tratamento. O nível de significância foi de 5%.

3.7. Preparo de Tampões, Soluções, Meios de Cultura, Reagentes

- Meio de cultura

7 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO[®]) e/ou Dubeccos' (GIBCO[®])

3 mL de soro bovino fetal (GIBCO[®])

0,3 mL de fitohemaglutinina (SIGMA[®])

0,1 mL de glutamina

- colchicina (0, 16%)

0,016 g de colchicina (SIGMA[®])

10 mL de água deionizada

- Solução de Cloreto de Potássio (KCl - 0,075 M)

5,6 g KCl (MERK[®])

1000 mL de água deionizada

- Fixador (3:1)

90 mL de metanol (MERK[®])

30 mL de ácido acético glacial (MERK[®])

- Tampão Sorënsen (0,06 M; pH 6,8)

4,372g Na₂HPO₄ (MERK[®])

4,536g KH₂PO₄ (MERK[®])

500 mL de água demonizada

- Giemsa

2g de giemsa (MERK[®])

120 mL de glicerina

120 mL de metanol (MERK[®])

Aquecer a 70°C a glicerina em banho maria, adicionar giemsa e misturar. Retirar a solução do banho maria e acrescentar o metanol. Deixar em repouso 30 dias para depois fazer a utilização.

- Coloração

25 µL de Giemsa

1 mL de tampão Sorënsen.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. População de Estudo

Foram avaliadas 10 pacientes com câncer de mama e 10 mulheres voluntárias que constituíram o grupo controle. A média (\pm DP) de idade das pacientes foi de $54,10 \pm 17,10$ anos (variação de 24-86 anos) e do grupo controle foi de $51,9 \pm 17,93$ anos (variação de 21-85 anos). As características individuais das pacientes (idade, cor da pele, tabagismo) e relacionadas ao tumor (mama afetada, tipo histológico) e ao esquema quimioterápico utilizado estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Características individuais das pacientes com câncer de mama.

Paciente	Idade	Tabagismo	Tipo de câncer	Drogas	Etnia	Mama
P1	49	Não	Ductal	A+C	B	D/E
P2	24	Não	Ductal	A+C	B	E
P3	60	Não	Lobular	A+C	B	D
P4	86	Sim	Ductal	C+Epi	B	E
P5	56	Sim	Ductal	C+Epi	B	E
P6	50	Não	Ductal	C+Epi	B	E
P7	67	Não	Ductal	CMF	B	D
P8	47	Não	Lobular	A+C	B	E
P9	65	Não	Ductal	C+Epi	N	D
P10	37	Não	Ductal	C+Epi	B	E

P-paciente; A-adriamicina; C-ciclofosfamida; Epi-Epirrubicina; M-metotrexato; F-5-fluoracil; B-branca; N-negra; D-direita; E-esquerda.

As características individuais das mulheres do grupo controle (idade, cor da pele, tabagismo) estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Dados das mulheres que constituíram o grupo controle.

Paciente	Tabagismo	Idade	Etnia
C1	Não	46	B
C2	Não	21	B
C3	Não	60	B
C4	Sim	85	B
C5	Sim	50	B
C6	Não	45	B
C7	Não	67	B
C8	Não	42	B
C9	Não	65	B
C10	Não	38	B

Cx-controle; B-branca.

A distribuição das pacientes de acordo com a faixa etária mostrou maior número de pacientes com câncer de mama na faixa entre 40 a 69 anos (Figura 1).

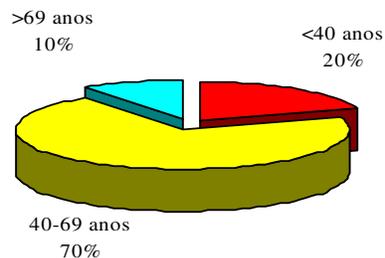


Figura 1. Distribuição de pacientes com câncer de mama (n=10) de acordo com a faixa etária (<40 anos; 40-69 anos e >69 anos).

Em apenas 3 (30%) casos foi observada história familiar positiva para o câncer de mama, enquanto que nas demais 7 (70%) pacientes não houve relato de história familiar. Considerando a etnia das pacientes, 9 (90%) eram brancas e apenas uma (10%) era negra.

Na maioria das pacientes (60%) o tumor se manifestou apenas na mama esquerda, enquanto que 3 (30%) apresentaram na mama direita e houve apenas um (10%) caso de câncer bilateral. Nesta paciente, foi observado que 51,7% das aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases estavam localizadas no cromossomo do grupo E. Apesar desta peculiaridade, esta paciente não apresentava pessoas da família com câncer de mama.

O tipo de tumor mais freqüente, de acordo com a classificação histológica, foi o carcinoma ductal, diagnosticado em oito (80%) casos. O carcinoma lobular foi detectado em apenas duas (20%) pacientes.

4.2. Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas que foram analisadas nas metáfases de linfócitos obtidos da circulação periférica de controles e pacientes. De um total de 4700 metáfases de pacientes analisadas foram encontradas 213 células (metáfases) com aberrações e um total de 244 aberrações. No grupo controle foi analisado 1000 metáfases e foram encontradas 12 células com AC e um total de 12 AC. As principais aberrações encontradas no grupo das pacientes e controles foram alterações simples, como quebras cromatídicas, *gaps*, quebras cromossômicas e fragmentos. Alterações complexas como: anéis, dicêntricos, trirradiais e quadrirradiais foram encontradas apenas nas pacientes, porém em menor freqüência (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases de pacientes com câncer de mama e no grupo controle.

Tipo de AC	N° de AC (%)	
	Controles	Pacientes
Gap cromatídico	3 (25%)	32 (13,11%)
Gap cromossômico	2 (16,66%)	39 (15,98%)
Quebra cromatídica	1 (8,33%)	38 (15,57%)
Quebra cromossômica	1 (8,33%)	67 (27,46%)
Anel	0 (0,0%)	3 (1,23%)
Dicêntrico	0 (0,0%)	6 (2,46%)
Fragmento	5 (41,66%)	57 (23,36%)
Trirradial	0 (0,0%)	1 (0,41%)
Quadrirradial	0 (0,0%)	1 (0,41%)
Total de Aberrações de Cromossômicas	12(100%)	244 (100%)
Número de Células com AC	12	213
Metáfases analisadas	1000	4700

A tabela 4 mostra os valores descritivos do TAC (Total de Aberrações de Cromossômicas) nos grupos controle e de pacientes antes da quimioterapia. Não houve aumento estatisticamente significativo no número de aberrações cromossômicas quando comparado ao grupo controle e ao grupo pré-quimioterapia.

Tabela 4. Número de aberrações cromossômicas no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.

GRUPOS	Aberrações cromossômicas/100 células			t-Student	
	n	V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}	p
Controle	10	0	1,2 ± 1,2	3	0,073
Pré-Quimioterapia	10	0	3,5 ± 3,6	12	

ANOVA-F medidas repetidas (F=3,259; p=0,105)

O teste t-Student não pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve p>0,05

Diferença não significante (p > 0,05)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

A tabela 5 mostra os valores descritivos do TAC (Total de Aberrações de Cromossômicas) nos grupos pacientes antes da quimioterapia e nos ciclos subsequentes, do primeiro ao quinto ciclo. Foi observado um aumento do TAC durante os ciclos de tratamento (1° ao 4°) quando comparado aos resultados obtidos antes da quimioterapia (pré-QT). Já no último ciclo de tratamento (quinto), os valores de TAC foram semelhantes aos obtidos no tempo pré-QT.

Tabela 5. Número de aberrações cromossômicas no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.

GRUPOS	n	Aberrações cromossômicas/100 células		
		V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}
Pré-Quimioterapia	10	0	3,5 ± 3,6	12
1° Ciclo	10	0	5,2 ± 4,6	16
2° Ciclo	8	1	7,4 ± 5,0	17
3° Ciclo	8	1	5,5 ± 4,2	14
4° Ciclo	5	3	7,0 ± 4,9	15
5° Ciclo	6	2	3,2 ± 1,5	5

ANOVA-F medidas repetidas (F=3,171; p=0,057)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

A tabela 6 demonstra os resultados da análise estatística referente aos dados apresentados na tabela 5. Houve aumento no número de aberrações cromossômicas ($p < 0,05$) no quarto ciclo de quimioterapia, quando comparado ao grupo pré-quimioterapia.

Tabela 6. Resultados estatísticos das análises do total de aberrações cromossômicas/100 pelo teste t- Student pareado.

COMPARAÇÕES		p ¹
Pré-Quimioterapia	1° Ciclo	0,188
	2° Ciclo	0,110
	3° Ciclo	0,436
	4° Ciclo	0,005*
	5° Ciclo	0,174
1° Ciclo	2° Ciclo	0,389
	3° Ciclo	0,927
	4° Ciclo	0,748
	5° Ciclo	0,185
2° Ciclo	3° Ciclo	0,051
	4° Ciclo	0,889
	5° Ciclo	0,084
3° Ciclo	4° Ciclo	0,293
	5° Ciclo	0,554
4° Ciclo	5° Ciclo	0,554

¹O teste t-Student pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve $p > 0,05$

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

Na tabela 7 são apresentados os valores descritivos do número de células com aberrações cromossômicas (CAC) nos grupos controle e de pacientes antes da quimioterapia. Da mesma forma como para o número total de AC, não houve aumento estatisticamente significativo de células com aberrações cromossômicas quando comparado ao grupo controle e ao grupo pré-quimioterapia.

Tabela 7. Número de células com aberrações cromossômicas/100 células no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.

GRUPOS	Células com AC/100 células				t-Student
	n	V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}	p
Controle	10	0	1,2 ± 1,2	3	0,073
Pré-Quimioterapia	10	0	3,5 ± 3,6	12	

ANOVA-F medidas repetidas (F=3,259; p=0,105)

O teste t-Student não pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve p>0,05

Diferença não significativa (p > 0,05)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

Na tabela 8 são apresentados os valores descritivos do número de células com aberrações cromossômicas (CAC) nos grupos de pacientes antes e durante os ciclos seqüenciais de quimioterapia. Da mesma forma como para o número total de AC, houve aumento do número de células com AC (CAC) nos ciclos de tratamento (1° ao 4°), quando comparado aos resultados obtidos antes da quimioterapia (pré-QT) e em relação ao grupo controle, retornando no último ciclo de tratamento a valores semelhantes aos obtidos no tempo pré-QT.

Tabela 8. Número de células com aberrações cromossômicas/100 células no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.

GRUPOS	n	Células com AC/100 células		
		V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}
Pré-Quimioterapia	10	0	3,5 ± 3,6	12
1° Ciclo	10	0	4,8 ± 3,8	13
2° Ciclo	8	1	5,1 ± 3,2	9
3° Ciclo	8	1	4,9 ± 3,0	9
4° Ciclo	5	3	6,2 ± 4,2	13
5° Ciclo	6	2	3,2 ± 1,2	5

ANOVA-F medidas repetidas (F=1,9419; p=0,174)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

A tabela 9 demonstra os resultados da análise estatística referente aos dados apresentados na tabela 8. Houve aumento no número de células com aberrações cromossômicas ($p < 0,05$) no quarto ciclo de quimioterapia, quando comparado ao grupo pré-quimioterapia.

Tabela 9. Resultados estatísticos das análises de células com aberrações cromossômicas/100 células pelo teste t- Student pareado.

COMPARAÇÕES		p ¹
Pré-Quimioterapia	1° Ciclo	0,274
	2° Ciclo	0,403
	3° Ciclo	0,528
	4° Ciclo	0,013*
	5° Ciclo	0,157
1° Ciclo	2° Ciclo	0,826
	3° Ciclo	0,950
	4° Ciclo	0,704
	5° Ciclo	0,106
2° Ciclo	3° Ciclo	0,404
	4° Ciclo	0,682
	5° Ciclo	0,140
3° Ciclo	4° Ciclo	0,339
	5° Ciclo	0,495
4° Ciclo	5° Ciclo	0,339

¹O teste t-Student pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve $p > 0,05$

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

As variáveis descritivas do Índice Mitótico (IM) nos grupos controle e de pacientes antes da quimioterapia são mostradas na tabela 10. O índice mitótico não apresentou diferença estatisticamente significativa comparando-se os grupos controle e paciente pré-quimioterapia.

Tabela 10. Medidas descritivas do Índice Mitótico (%) no grupo controle e grupo de pacientes antes da quimioterapia.

GRUPOS	Índice Mitótico (%)				t-Student
	n	V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}	p
Controle	10	0,7	2,0 ± 1,0	4,3	0,846
Pré-Quimioterapia	10	1,0	2,0 ± 0,8	3,0	

ANOVA-F medidas repetidas (F=0,044; p=0,838)

O teste t-Student não pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve p>0,05

Diferença não significativa (p > 0,05)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

A tabela 11 mostra os valores descritivos do Índice Mitótico (IM) nos grupos pacientes antes da quimioterapia e nos ciclos subsequentes, do primeiro ao quinto ciclo.

Tabela 11. Medidas descritivas do Índice Mitótico (%) no grupo de pacientes antes e durante os ciclos de quimioterapia.

GRUPOS	n	Índice Mitótico (%)		
		V _{MIN}	Média ± DP	V _{MAX}
Pré-Quimioterapia	10	1,0	2,0 ± 0,8	3,0
1° Ciclo	10	0,2	1,6 ± 0,6	2,6
2° Ciclo	8	0,3	2,1 ± 2,1	7,1
3° Ciclo	8	0,7	1,1 ± 0,4	2,0
4° Ciclo	5	1,1	1,5 ± 0,6	2,6
5° Ciclo	6	1,0	2,1 ± 1,0	3,5

ANOVA-F medidas repetidas (F=1,294; p=0,340)

n = Número de indivíduos; Média ± DP = Média ± desvio padrão; V_{MIN}; V_{MAX} = Valores mínimo e máximo, respectivamente.

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

A tabela 12 demonstra os resultados da análise estatística referente aos dados apresentados na tabela 11. Houve diferença estatisticamente significativa no índice mitótico ($p < 0,05$) no terceiro ciclo quando comparado a antes da quimioterapia e ao primeiro ciclo e no quinto ciclo quando comparado ao terceiro e ao quarto ciclo de quimioterapia.

Tabela 12. Resultados estatísticos das análises de Índice Mitótico (%) pelo teste t- Student pareado.

COMPARAÇÕES		p ¹
Pré-Quimioterapia	1° Ciclo	0,079
	2° Ciclo	0,973
	3° Ciclo	0,0017*
	4° Ciclo	0,152
	5° Ciclo	0,889
1° Ciclo	2° Ciclo	0,530
	3° Ciclo	0,015*
	4° Ciclo	0,927
	5° Ciclo	0,144
2° Ciclo	3° Ciclo	0,290
	4° Ciclo	0,469
	5° Ciclo	0,563
3° Ciclo	4° Ciclo	0,154
	5° Ciclo	0,034*
4° Ciclo	5° Ciclo	0,027*

¹O teste t-Student pareado foi utilizado quando ANOVA-F teve $p > 0,05$

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

As pacientes foram avaliadas do primeiro ao quinto ciclo de quimioterapia, com intervalos de cerca de 21 dias entre cada ciclo.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A finalidade deste estudo foi analisar a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de mulheres diagnosticadas com câncer de mama e submetidas a tratamento com quimioterapia neoadjuvante, e para isso a coleta de amostras ocorreu antes e durante o tratamento. A quimioterapia é feita por infusão intravenosa de quimioterápicos com alto poder de ação sobre o material genético, atingindo as células do organismo como um todo e induzindo efeitos colaterais sérios nas pacientes.

Estudos citogenéticos constituem um sistema clássico de avaliação de mutagenicidade e clastogenicidade recomendado pelos *guidelines* por sua sensibilidade em responder a agentes indutores de danos no DNA, como quebras e outras alterações.

Na obtenção de metáfases para estudo de alterações citogenéticas, um material comumente utilizado são os linfócitos obtidos de sangue periférico e colocados em cultura (AMARA-MORKANE *et al.*, 1996). Cariótipos obtidos de linfócitos têm sido utilizados na observação de alterações cromossômicas desde que o genoma humano contém um total de 3,2 bilhões de pares de bases distribuídos em 23 pares de cromossomos, e qualquer alteração no DNA pode ser detectada nos cromossomos (BERNADINI; WEBERPALS; SQUIRE, 2004). A frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico humano tem sido usada por décadas como um biomarcador dos efeitos iniciais induzidos pela exposição ocupacional ou por tratamento quimioterápico com carcinógenos, em tecidos específicos. Assumindo-se que os mecanismos de formação dos danos cromossômicos são semelhantes em diferentes tecidos, os níveis de danos em linfócitos podem refletir o nível de danos induzidos em outros tecidos (NORPPA *et al.*, 2006). O acúmulo de anormalidades cromossômicas, tais como rearranjos, amplificações e deleções pode afetar genes críticos envolvidos no controle e proliferação, diferenciação e

sobrevivência celular e assim direcionar os processos de múltiplas etapas do desenvolvimento e progressão do câncer (GOODISON *et al.*, 2005).

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais incidente nas mulheres no Brasil e especificamente na região sudeste, sendo uma das principais causas de morte em mulheres (INCA, 2007). Dentre as pacientes com câncer de mama avaliadas neste estudo, 70% apresentavam idade entre 40 a 69 anos, em acordo com dados recentes de que a maior incidência do câncer de mama atinge mulheres dessa faixa etária (INCA, 2007).

Considerando o sítio do tumor, a mama esquerda foi a mais afetada. É descrito que a maior ocorrência de câncer na mama esquerda pode ser devido ao fato desta ser mais volumosa que a direita e, portanto, o aumento de tecido mamário estaria associado à maior probabilidade de sofrer mutações (SILVA; TAKAHASHI; CARRARA, 2002).

No grupo de pacientes avaliado, apenas uma era negra, em acordo com outros estudos (SILVA; TAKAHASHI; CARRARA, 2002), assim como também relatado na Europa, Estados Unidos e Coréia (LANNIN *et al.*, 1998). Entretanto, é observada taxa de mortalidade mais elevada em mulheres negras americanas, comparado a mulheres brancas, independente da idade, e principalmente em consequência de diagnóstico em estádios mais avançados da doença (JATOI *et al.*, 2005). Muitos estudos citogenéticos têm demonstrado que mulheres brancas com câncer de mama apresentam mais alterações cromossômicas em relação às outras etnias (PACKEISEN *et al.*, 2005). Em relação à resposta ao tratamento, a diferença racial não se mostrou evidente, apesar de relato de grande variabilidade genética inter-racial na atividade de enzimas metabólicas (ANDERSON, 2005).

Alguns parâmetros devem ser observados para que o câncer de mama possa ser considerado como hereditário: No mínimo quatro ou mais mulheres afetadas na família; manifestação antes dos 40 anos de idade; frequentemente bilateral e associação com câncer de ovário (HILL *et al.*, 2002 e ROSEN *et al.*, 2003). Neste trabalho, duas pacientes tiveram

câncer de mama antes dos 40 anos de idade e uma manifestou com câncer bilateral, é provável que essas pacientes tenham câncer hereditário, mas para se ter um diagnóstico correto há a necessidade estudos adicionais que comprovem esses dados. Tem-se que considerar também que a incidência de câncer hereditário é de apenas 10%, enquanto o não-hereditário ou esporádico é de 90%; portanto, é provável que a maioria das pacientes deste estudo tenha câncer não hereditário. O risco de câncer de mama aumenta com história familiar positiva, devido a fatores genéticos envolvidos (BRODY; BIESECKER, 1998).

O carcinoma ductal da mama foi mais freqüente que o carcinoma lobular, em acordo com outros estudos que relataram maior freqüência de carcinoma ductal invasivo em mulheres americanas (BERG; HUTTLER, 1995). Um levantamento realizado recentemente pelo Serviço de Mastologia do HE/UFTM, avaliando pacientes com câncer de mama diagnosticadas e tratadas no hospital universitário, demonstrou que 90,6% dos casos eram de carcinoma ductal.

O sangue não foi coletado de todas as pacientes em todos os ciclos por várias razões, tais como: paciente ter recebido transfusão de sangue devido à baixa quantidade de leucócitos, dificuldade de punção de veias para a retirada das amostras de sangue e a própria debilidade da paciente frente ao tratamento. Apesar da dificuldade de coleta das amostras de sangue e pequeno número de pacientes, o estudo mostrou-se representativo em relação à população, sendo as características semelhantes a trabalhos descritos.

As alterações observadas nos cromossomos do grupo E da paciente 01 podem estar relacionadas à inativação de genes supressores de tumor ou ativação de proto-oncogenes, tais como, *p53*, *BRCA*, *E-caderina* e *HER-2*, encontrados nos cromossomos deste grupo. O gene *p53*, situado no cromossomo 17, regula o ciclo celular interrompendo-o, a fim de que o dano seja reparado (LEVINE, 1997). O *BRCA1* está, também, localizado no cromossomo

17, e tem como função a regulação do reparo do DNA e sua inativação pode levar a anormalidade espontânea na estrutura do DNA (VENKITARAMAN, 2002). O gene da *E-caderina*, no cromossomo 16, é responsável pela fisiologia e adesão da membrana, e a perda de função leva à diminuição da adesão entre as células, tendo como característica progressão celular e metástase (HAJRA; FEARON, 2002). A alteração do proto-oncogene *HER-2*, localizado no cromossomo 17, está relacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores sólidos (RENNSTAM *et al.*, 2007).

Para avaliação das aberrações cromossômicas residuais induzidas pelo tratamento quimioterápico e obtenção do maior número de metáfases, a coleta do sangue foi realizada no momento em que a paciente ia receber o tratamento, após o tempo de recuperação da aplasia medular (21 dias em média), sendo que as culturas foram mantidas por 72 horas. Dessa forma esperava-se obter as aberrações cromossômicas estáveis e que não foram eliminadas pelas células durante o reparo. No presente estudo foi observada redução no número de metáfases nas células das pacientes após serem submetidas ao tratamento quimioterápico. Uma possível explicação se deve à diminuição de leucócitos após a terapia, uma vez que os fármacos usados atuam como mielosupressores. Tucker *et al.* (1990) observaram que alterações cromossômicas podem permanecer em linfócitos de pacientes por até nove meses após o término do tratamento quimioterápico.

As aberrações cromossômicas observadas em maior frequência no grupo controle e nas pacientes com câncer de mama foram alterações simples como *gaps*, quebras cromatídicas, quebras cromossômicas e fragmentos. Estes resultados são condizentes com os dados de Norppa *et al.*, (2006) que relacionam o surgimento principalmente de quebras cromatídicas em resposta à ação de agentes quimioterápicos. Nos trabalhos de teste de radiosensibilidade em G₂ à quimioterapia, foi também observada maior frequência de quebras e *gaps* (BARIA *et al.*, 2001).

A frequência das aberrações cromossômicas encontradas nos indivíduos do grupo controle foi de 1,2% e está dentro dos valores propostos como frequência basal para indivíduos saudáveis, que é de 1 a 2% (PRESTON; SAN SEBASTIAN; McFEE, 1987).

Foi observado um aumento tanto na frequência de células com aberrações como no total de aberrações entre os grupos controle e de pacientes antes da quimioterapia, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Outros estudos também não observaram diferenças na frequência de AC antes do tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de mama, comparado ao grupo controle (LÉGAL *et al.*, 2002). Entretanto, Blasiak *et al* (2004) encontraram mais danos no DNA de pacientes com câncer de mama do que em mulheres controles, utilizando o teste cometa. Foi também relatado que a sensibilidade à indução de dano cromossômico pela radiação, verificado pelo teste de micronúcleo, foi maior em linfócitos de pacientes com câncer de mama que em controles saudáveis (SCOTT *et al.*, 1999). Foi demonstrado no trabalho de Varga *et al.* (2006) uma diferença significativa entre pacientes com câncer de mama esporádico e controles pelo teste de micronúcleo. Esta diferença pode ser devida ao teste de AC, e os danos podem ser reparados no ponto de checagem da transição da fase G2 e a mitose, diminuindo, assim, os danos citogenéticos encontrados.

Após o tratamento quimioterápico houve aumento na frequência de AC nas amostras obtidas de pacientes, comparado ao tempo pré-quimioterapia, de forma estatisticamente significativa no quarto ciclo. Já no último ciclo de quimioterapia houve um decréscimo na frequência de aberrações, atingindo valores próximos aos encontrados antes da quimioterapia (pré-QT). Padjas *et al.* (2005) encontraram aumento na frequência de micronúcleos na primeira metade da terapia, com pico no segundo e terceiro ciclo, e um posterior declínio com a continuação do tratamento de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células e pacientes com câncer de ovário, atingindo em alguns pacientes valores

abaixo do nível pré-tratamento. Esses autores apresentam dois possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos nesses resultados: 1) a re-população dos leucócitos foi maior que a formação de danos citogenéticos ou, 2) os linfócitos se tornaram resistentes às drogas quimioterápicas. Entretanto, também foi descrito um acúmulo de AC nos dois últimos ciclos de quimioterapia, demonstrando a dificuldade de recuperação do dano induzido pela quimioterapia (SILVA; TAKAHASHI; CARRARA, 2002).

Uma abordagem que pode ser utilizada nos estudos citogenéticos é a análise de proliferação e progressão celular em tecidos expostos a agentes clastogênicos, no sentido de observar a influência dos mesmos na regulação do ciclo celular. Qualquer distúrbio nos eventos que controlam a progressão das células em divisão pode impedir que as mesmas sigam o curso normal e estas podem ficar paradas em uma fase ou ser induzidas à apoptose (M'BEMBA; LEMEUX; CHAKRABARTAI, 2006). O índice mitótico depende não apenas da proporção de células em trânsito na mitose, mas também do tempo em que estas permanecem na fase. Portanto, uma elevação do índice mitótico pode ser causada por um aumento no tempo em que as células ficam em mitose (ALISON, 1995). Não foi encontrada diferença estatística entre o grupo com câncer antes da quimioterapia e o grupo controle, em relação ao índice mitótico, talvez em decorrência de não ter tido aumento no número de AC entre controles e pacientes. Foi encontrada uma significativa diminuição do IM no terceiro ciclo em relação ao tempo pré-quimioterapia e ao primeiro ciclo, e um aumento de AC, apesar de este não ter diferença estatística, mostrando que as células ainda não estavam sendo reparadas. Entretanto, também foi encontrado aumento do IM no quinto ciclo, quando comparado ao terceiro e ao quarto ciclos, mostrando que as células começaram a reparar os danos causados pela quimioterapia, levando à diminuição das AC no último ciclo de quimioterapia a valores pré-tratamento.

A grande variabilidade interindividual observada nas amostras pode ser decorrente da diferença individual do metabolismo das drogas quimioterápicas, o que faz com que cada indivíduo responda de uma forma quando submetido ao tratamento. A quimioterapia aumenta o processo de morte e remoção de linfócitos do sangue periférico, pois os leucócitos em geral são sensíveis às drogas anticâncer, podendo isto ser observado através do declínio no número dos leucócitos (PADJAS *et al.*, 2005). A variabilidade pode ser atribuída a vários fatores como susceptibilidade individual, interação com as drogas (D'ALESIO *et al.*, 2003) e fatores genéticos, que fazem com que as pessoas possuam quantidades diferentes de enzimas, responsáveis pelo metabolismo das drogas (ANDERSON, 2005).

A persistência de alta frequência de células com rearranjos estáveis aparentemente por muitos anos, após ter cessado a terapia com ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoracil, sugere que estas células, apesar de possuírem aberrações graves, tornam-se progenitores viáveis no sentido de permitir a sobrevivência e a proliferação celular (UDAYAKUMAR; BHARGAVA, 1996). Neste contexto, Pagano *et al.* (1999) observou aumento de doenças hematológicas secundárias à administração de quimioterápicos no tratamento de câncer.

Apesar do pequeno tamanho da amostra e variabilidade individual encontrada entre as pacientes, observou-se um aumento de AC até o quarto ciclo e uma diminuição no último, mostrando uma provável reparação dos danos pelas células. Em conjunto, os resultados sugerem que a avaliação do dano citogenético de linfócitos de pacientes com câncer de mama podem estimar a sensibilidade ao tratamento quimioterápico, considerando que a permanência de aberrações cromossômicas estáveis pode levar ao aumento de risco de uma neoplasia secundária.

A despeito dos efeitos secundários oriundos do tratamento quimioterápico, tem sido observado durante as últimas décadas um aumento na taxa de sobrevivência de pacientes

com câncer de mama, em virtude da detecção da doença em estádios iniciais e de novos métodos de tratamento (KARLSSON et al., 2007). Existem dados comprovando que a terapia neoadjuvante em mulheres com câncer de mama avançado tem aumentado em cerca de 10-20% a taxa de sobrevivência em 5 anos (MOON *et al.*, 2005).

Conclusões

CONCLUSÕES

- Não foram observadas diferenças na frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis. Porém, a quimioterapia induziu a um aumento no número de aberrações, com pico observado após o quarto ciclo de quimioterapia.
- A frequência de aberrações cromossômicas residuais após cada ciclo de quimioterapia não mostrou diferença estatística significativa entre as pacientes com câncer de mama.

A quimioterapia aumentou a frequência de aberrações até o quarto ciclo e, posteriormente, no quinto ciclo, diminuiu. Mostrando que as células começaram a reparar os danos causados pela quimioterapia. A avaliação do dano citogenético de linfócitos de pacientes com câncer de mama podem estimar a sensibilidade ao tratamento quimioterápico, o aumento de aberrações cromossômicas estáveis pode levar ao aumento de risco de uma neoplasia secundária.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISON, M. R. Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? **Human & Experimental Toxicology**, v. 14, p. 935-44.

AMARA-MOKRANE, Y. A. et al. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin en cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 132, n. 1, p. 108-13, 1996.

ANDERSON, G. D. Sex and differences in pharmacological response: Where is the evidence? Pharmacogenetics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. **J. Women's Health**, v. 4, n. 1, p. 19-29, 2005.

BARIA, K. et al. Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? **Br. J. Cancer**, v. 84, n. 7, p. 892-6, 2001.

BARIA, K. et al. Chromosomal radio sensitivity young cancer patients: possible evidence of genetic predisposition. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 78, p. 341-6, 2002.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 238-44, 2003.

BEAHR, O. H. Staging of cancer of the breast as a guide to therapy. **Cancer**, v.53, p. 592-4, 1984.

BERG, J. B; HUTTER, R. V. P. Breast cancer. **Cancer supplement**, v. 75, n. 1, p. 257-69, 1995.

BERNADINI, M.; WEBERPALS, J.; SQUIRE, J. A. The use of cytogenetics in understanding ovarian cancer. **Biomed. Pharmac.**, v.58, p.17-23, 2004.

BISHOP, J. B.; WITT, K. L.; SLOANE, R. A. Genetic toxicities of human teratogens, **Mutat. Res.**, v. 396, p. 9-43, 1997.

BLASIAK, J. et al. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. **Mutat. Res.**, v. 554, p. 139-48, 2004.

BOER, J. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. **Mutat. Res.**, v. 509, p. 201-10, 2002.

BONASSI et al. Are chromosome aberration in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in human. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 79, p. 133-5, 1995.

BONASSI; S. et al. Chromosome aberrations in lymphocytes predict cancer human independently of exposure to carcinogens. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1619-25, 2000.

BORGMANN, K. et al. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy head and neck cancer: Fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. **Radiother. Oncol.**, v. 64, p. 141-52, 2002.

BRODY, L. C.; BIESECKER, B. B. Breast Cancer Susceptibility Genes. **Medicine**, V. 77, p. 208-26, 1998.

BURRILL, W. et al. Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 76, p. 1617-9, 2000.

CHANG, J. C.; HILSENBECK, S. G.; FUQUA, S. A. W. Genomic approaches in management and treatment of breast cancer. **Br. J. Cancer**, p. 1-7, 2005)

CHINTAMANI et al. Is drug-induced toxicity a good predictor of response to neo-adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer? - A prospective clinical study. **BioMed Central Cancer**, v. 4, n. 48, p.1-9, 2004.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, p. 3-34, 2003.

CLARK, G. M. Interpreting and interating risk factors for patients with primary breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n.30, 2001.

COCQUYT, V. F. et al. Different responses to preoperative chemotherapy for invasive lobular and invasive ductal breast carcinoma. **EJSO**, v. 29, p. 361-7, 2003.

D'ALESIO, V. et al. Lymph nodes in the irradiated field influence the yield of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes from breast cancer patients. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 57, n. 3, p. 732-8, 2003.

DIXON, K.; KOPRAS, E. Genetic alterations DNA repair in human carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v.14, p. 441-448, 2004.

GISSELSSON, D. Chromosomal Instability in Cancer – Causes and consequences. Atlas **Cytogenet. Oncol. Haematol.** 2001. Acessado em 29/09/2003.

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/ChromosomInstabilID20023.html>

GOODISON, S. et al. Molecular cytogenetic analysis of a human breast metastasis model: identification of phenotype-specific chromosomal rearrangements. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 156, p. 37–48, 2005.

GORRINGE, K. L. *et al.* Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 923-30, 2005.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n.20, p. 1593-603, 2002.

HAJRA, K. M.; FEARON, E. R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 34, p. 255-68, 2002.

HARNDEN, D. G. Inherited factors in leukaemia and lymphoma. **Leuk. Res.**, v. 9, p. 705-7, 1985.

HEDDLE, J. A. et al. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. **Cancer Res.**, v. 38, 2983-8, 1978.

HILL, A. et al. Medical radiation, family history of cancer, and benign breast cancer disease in relation to breast cancer risk in young women, USA. **Cancer Causes and Control**, v. 13, p. 711-8, 2002.

HORTOBAGYI G. N. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy. **Cancer**, v. 62, p. 2507-16, 1988.

HSU, T. C. et al. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans. Possible relationship to environmental carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 43, p. 403-9, 1989.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). **Câncer de mama**. 2007. Acesso em 17/03/2007. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336 >.

JATOI, I. et al. Breast cancer trends among black and white women in the United States. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 7836-41, 2005.

KARLSSON, E. et al. Chromosomal changes associated with clinical outcome in lymph node-negative breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 172, p. 139-146, 2007.

LANNIN, D.R. et al. Influence of socioeconomic and cultural factors on racial differences in late-stage presentation of breast cancer. **JAMA**, v. 279, p. 1801-7, 1998.

LÉGAL, J-D et al. Chromosomal aberration induced by chemotherapy and radiotherapy in lymphocytes from patients with breast carcinoma. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 52, n. 5, p. 1186-95, 2002.

LEVINE, A.J. p53, The cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, p. 323-31, 1997.

M'BEMBA, P.; LEMEUX. N.; CHAKRABARTAI, S. K. Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Archives of Toxicology**, PMID: 16826409, 2006.

MOON, Y. M. et al. Neoadjuvant chemotherapy with infusional 5-fluoracil, adriamycin and cyclophosphamide (iFAC) in locally advanced breast cancer: an early response predicts good prognosis. **Annals of Oncology**, v. 16, p. 1778-85, 2005.

MOORHEAD, P. S. et al. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, v.20, p. 613-6, 1960.

MORENO, A. et al. Pathologic changes related to CMF primary chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.75, p. 119-25, 2002.

NORPPA H. et al., Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, v. 600, p. 37-45, 2006.

PACKEISEN, J. et al. Cytogenetic differences in breast cancer samples between German and Japanese patients. **J Clin Pathol**, v. 58, p. 1101–3, 2005.

PADJAS, A. et al. Cytogenetic damage in lymphocytes of patients undergoing therapy for small cell lung cancer and ovarian carcinoma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, p. 183-91, 2005.

PAGANO, L. et al. Secondary haematological neoplasm after treatment of adult acute lymphoblastic leukaemia: analysis of 1170 adult ALL patients enrolled in the GIMEMA trials. *Br. J. Haematol.*, v. 100, p. 669-76, 1999.

PATERSON, M. C.; SMITH, P. J. Ataxia telangiectasia – an inherited human disorder involving hypersensitivity in ionizing radiation and related DNA-damaging chemicals. **Ann. Rev. Genet.**, v. 13, p. 291-318, 1979.

PARSHAD, R. *et al.* Carrier detection in xeroderma pigmentoso. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p.135-8, 1996.

PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenic of chemical agents. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 175-83, 1987.

RENNSTAM, K. et al. Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 172, p. 95-106, 2007.

ROSEN, E.M. et al. BRCA1 Gene in Breast Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 19-41, 2003.

ROUSE, J.; JACKSON, S. P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of damage DNA. **Science**, v. 297, p. 547-51, 2002.

SAVAGE, J. R. K. A note on inter-arm intrachange patterns resulting from dual-arm fish painting. **Mutat. Res.**, v. 373, p. 265-9, 1997.

SAVAGE, J. R. K.; SIMPSON, P. J. FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 51-60, 1994.

SCOTT, D. et al. Increase chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 75, p. 1-10, 1999.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D. M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature**, v. 408, p. 429-32, 2000.

SILVA, L. M.; TAKAHASHI, C. S.; CARRARA, H. H. A. Study of damage in patients with breast cancer treat by two antineoplastic treatments. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 22, p. 257-69, 2002.

TANNER, M. M. et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. **Clin. Cancer Res.**, v. 1, p. 1455-61, 1995

TRENZ, K. et al. Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 279-88, 2003.

TUCKER, J. D. et al. Induction, accumulation, and persistence of sister chromatid exchanges in women with breast cancer receiving cyclophosphamide, adriamycin, and 5-fluorouracil chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 50, p. 4951-6, 1990.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanged, and risk assessment. **Mutat. Res.**, v. 365, p. 147-59, 1996.

UDAYAKUMAR, A. M.; BHARGAVA, M. K. Persistence of chromosomal aberration in blood lymphocytes 11 years after cessation of CMF therapy in a breast cancer patient. **Cancer Letters**, v. 107, p. 1-3, 1996.

VARGA, D. et al. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls. **Mutagenesis**, v. 21, p. 313-20, 2006.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, p. 171-82, 2002.

YUNIS, J. J. The chromosomal basis of human neoplasia. **Science**, v. 221, p. 227-36, 1983.

Anexos



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DISCIPLINA DE GENÉTICA - DCB**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

**TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO EM MULHERES PORTADORAS DE
CÂNCER DE MAMA**

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Francisca da Luz Dias

Contato: 3318 5434

ESCLARECIMENTO

As mulheres estão sujeitas a apresentar doenças em sua mama, que podem ser desde um simples caroço até doenças mais graves como o câncer de mama. Fazer a prevenção dessas doenças fazendo o auto-exame ou indo ao médico regularmente ajuda muito no tratamento e cura dessas doenças. A quimioterapia é uma forma de tratamento que é usada quando o tumor já começou a se desenvolver e os remédios usados vão destruir as suas células. Nosso trabalho é verificar o efeito desses remédios usados no sangue. Para isso precisamos colher 5 ml do seu sangue antes, durante e após o tratamento. A coleta será feita por pessoa habilitada, com material esterilizado e descartável. O sangue será usado única e exclusivamente para a pesquisa e seu nome em nenhuma hipótese será divulgado.

CONSENTIMENTO

Eu, _____,
residente, _____,
li e compreendi as informações sobre o trabalho e de sua importância para o tratamento de mulheres com câncer de mama. Concordo com a pesquisa doando amostra do meu sangue, certa das medidas de segurança que serão tomadas para evitar riscos que este procedimento poderá me causar e de que poderei cancelar este consentimento a qualquer momento e deixar de participar deste trabalho.
Concordo em participar da pesquisa, assino junto a uma testemunha.

Uberaba, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura da testemunha

Pesquisador responsável