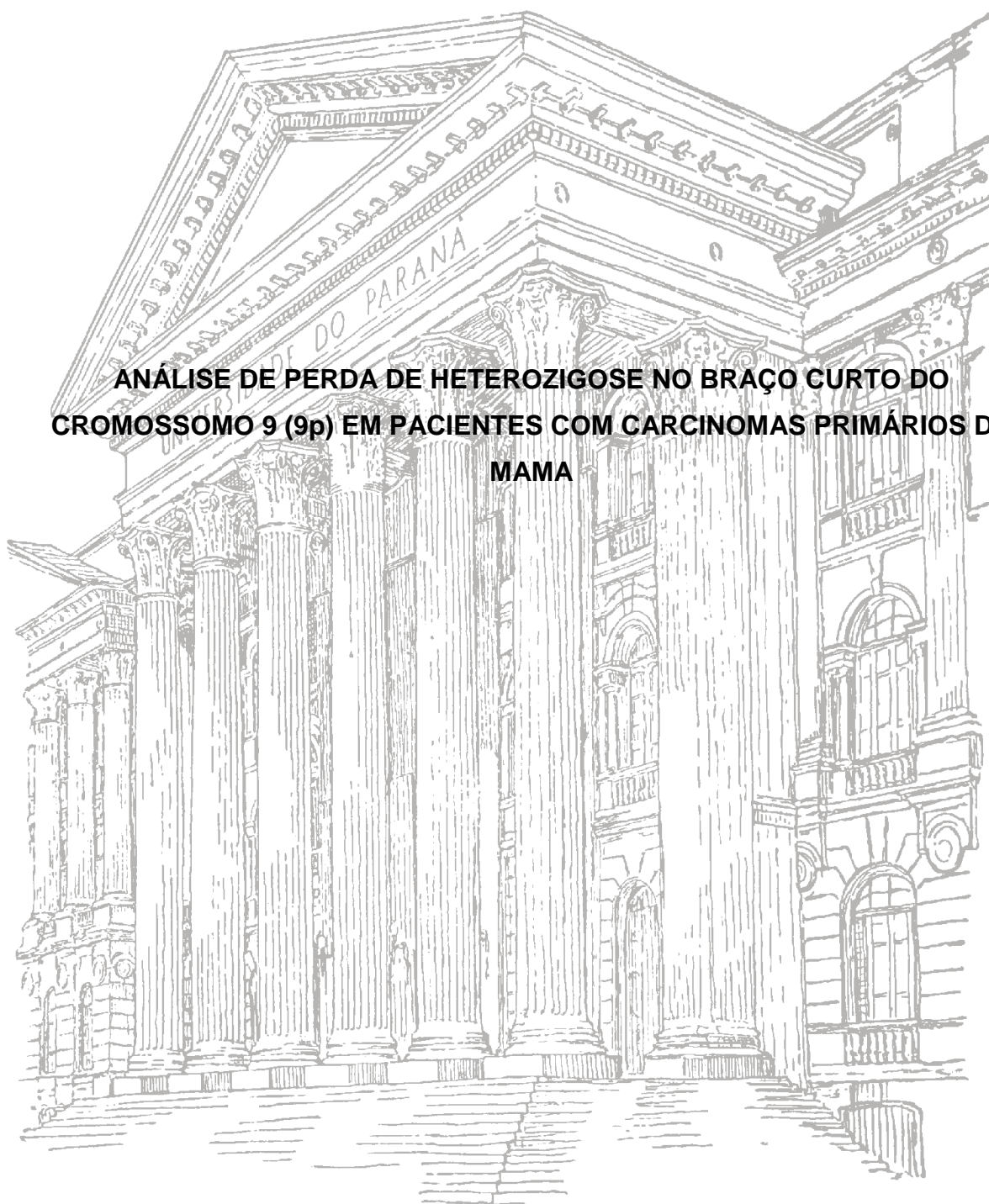


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 9 (9p) EM PACIENTES COM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA**



CURITIBA

2009

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NO BRAÇO CURTO DO
CROMOSSOMO 9 (9p) EM PACIENTES COM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2009

Dedico este trabalho a minha “pequena” família, pai, mãe, Anna, Cecília, Sophia. Tudo o que sou, faço e sonho só é possível com a ajuda, paciência, conselhos e principalmente carinho de vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus *orientadores*, Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pelo exemplo de professores, pesquisadores, orientadores e principalmente amigos. Meus sinceros agradecimentos por todos os conselhos, idéias e apoio em vários momentos da minha vida, tanto acadêmica quanto pessoal. Com vocês, a pesquisa se torna um detalhe de todo um aprendizado de vida!

À minha *banca* de acompanhamento e de defesa, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, Prof^a. Dr^a Eleidi Chautard Freire Maia, Prof. Dr. Cícero Andrade Urban, Prof^a. Dr^a. Cláudia Aparecida Rainho e Prof^a. Dr^a. Lupe Furtado Alle. Obrigado pela disponibilidade e pela atenção prestada. Com certeza a participação de vocês só fez aumentar a qualidade deste trabalho e foi um grande ensinamento para mim.

Aos meus *amigos* do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pela convivência, auxílio e amizade em todos os momentos e por tornarem nosso ambiente de trabalho sempre agradável.

A todos os meus amigos e amigas, que muitas vezes acreditaram mais em mim do que eu mesma! E ao Marcos, pela convivência, carinho e apoio.

Aos meus *pais*, por sempre acreditarem nos meus sonhos e possibilitarem todos eles. Contar com o apoio de vocês sempre fez parte da minha vida. E obrigado principalmente pelo amor, que justifica tudo!

Às minhas *irmãs*, pela sensibilidade, amizade, companheirismo e paciência. Assim como eu faço parte da educação e personalidade de vocês, vocês com certeza também fazem parte da minha. Ao Rodrigo, que também já faz parte da família e, mais que cunhado, é um grande amigo.

Família, sem vocês nada tem sentido!

À *Deus*, pela saúde e força de vontade de seguir em frente!

**“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas ...”**

Luis Fernando Verissimo

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e o mais comum entre as mulheres. Nestes tumores perdas alélicas são frequentemente observadas e trabalhos sobre a perda de heterozigose (LOH) no braço curto do cromossomo 9 (9p) sugerem o envolvimento de genes supressores de tumor, como o gene *CDKN2A* (9p21.3), no início e progressão do câncer de mama. Neste estudo, analisamos a LOH e a instabilidade de microssatélites (IM) em 229 pacientes com tumor primário de mama utilizando cinco marcadores microssatélites localizados em 9p: D9S1749, D9S1748, D9S171, D9S169 e D9S200. LOH e IM foram analisadas pelo software *Fragment Profiler 2.1*, após amplificação por PCR com os marcadores microssatélites em amostras de DNA obtidas de tecido tumoral congelado e sangue periférico (amostra normal) das pacientes, seguida de corrida eletroforética em sequenciador capilar de DNA *Megabace 1000*. Os seguintes testes estatísticos foram utilizados para analisar os resultados de LOH e os parâmetros clínicos e histopatológicos, comparação com outros trabalhos da literatura e caracterização epidemiológica da amostra: qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste G, teste *t*, análise da variância e coeficiente de regressão. Foram observadas baixas frequências de LOH em todos os locos analisados, variando de 10,29% (D9S169) a 15,97% (D9S1749). A IM também foi observada em todos os locos, com frequências entre 1,29% (D9S200) a 3,68% (D9S169). Em relação às frequências de LOH e os parâmetros clínicos e histopatológicos, apenas os tamanhos dos tumores com LOH no marcador D9S200 apresentaram média superior a dos tumores sem LOH ($t=2,81$; $p<0,05$). Todos os carcinomas lobulares da amostra eram positivos para o RE, havendo diferenças quanto à distribuição das frequências de RE+/- entre os subtipos (Teste Exato de Fisher: $p<0,05$). A média dos tamanhos dos tumores foi maior entre as pacientes que apresentaram metástases em linfonodos axilares ($t= 3,70$; $p<0,05$), e a média de idade foi menor ($t= 6,42$; $p<0,001$). A presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares não se distribuíram igualmente nos diferentes graus histológicos dos tumores ($\chi^2_2= 9,34$; $p<0,001$). Com base nos nossos resultados, concluímos que a LOH é um dos mecanismos envolvidos na inativação de genes supressores de tumor em 9p em tumores mamários, juntamente com os mecanismos epigenéticos e mutações gênicas. Porém, parece não apresentar a mesma relevância observada em outros tumores, como por exemplo, aqueles de cabeça e pescoço.

Palavras-Chave: Câncer de mama. Perda de heterozigose. Instabilidade de microssatélites. 9p.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most frequent type of cancer, and the most common among women. Allelic losses are frequent events in this tumor type, and loss of heterozygosity (LOH) studies at the short arm of chromosome 9 (9p), suggest the involvement of tumor suppressor genes like *CDKN2A* (9p21.3) in the initiation and progression of cancer. We analyzed LOH and microsatellite instability (MSI) in 229 patients with primary breast cancer using five microsatellite markers at 9p: D9S1749, D9S1748, D9S171, D9S169 e D9S200. DNA from frozen tumor tissue and peripheral blood (normal reference) from patients was analyzed for LOH and MSI after polymerase chain reaction for all microsatellite markers using the Fragment Profiler software (MEGABACE 1000 *Applied Biosystems*). Qui-square, Fisher-exact test, G-test, *t*-test, variance and regression coefficient were used to analyze the association between LOH and clinical histopathological parameters of patients, comparisons with the literature and epidemiological characterization of the samples. The LOH rates detected for all markers were low, ranged from 10,29% (D9S169) to 15,97% (D9S1749). The frequency of MSI among the DNA markers varied from 1,29% (D9S200) to 3,68% (D9S169). An association between the frequencies of LOH and clinical and histopathological parameters was found only for presence of LOH at marker D9S200 and tumor size, the mean for tumors without LOH was higher ($t=2,81$; $p<0,05$). All lobular carcinomas were positive to ER, with different frequency distribution of ER+/- among the histological subtypes (Teste Exato de Fisher: $p<0,05$). For patients with axillary lymph node metastasis mean tumor size was higher ($t = 3,70$; $p <0,05$), and average age was lower ($t = 6,42$; $p <0,001$). The presence or absence of metastasis in axillary lymph nodes was not equally distributed in the different histological grades ($\chi^2_2= 9,34$; $p<0,001$). Our results show, however, that LOH is one of the mechanisms involved in the inactivation of tumor suppressor genes at 9p, in addition to epigenetic alterations and gene mutations. Nevertheless, allelic loss in this region doesn't seem to have the same relevance than in other types of tumors, like those of the head and neck.

Keywords: Breast cancer. Loss of heterozygosity. Microsatellite instability. 9p.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	MECANISMO DE AÇÃO DO ONCOGENE <i>RAS</i>	19
FIGURA 02	MODELO DE INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR.....	20
FIGURA 03	ANATOMIA DA MAMA FEMININA.....	25
FIGURA 04	LINFONODOS MAIS COMUNS QUE APRESENTAM METÁSTASES MAMÁRIAS.....	27
FIGURA 05	PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	28
FIGURA 06	CLASSIFICAÇÃO TNM.....	33
QUADRO 01	MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS UTILIZADOS.....	61
QUADRO 02	COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	62
FIGURA 07	INDIVÍDUO HOMOZIGOTO NO TECIDO NORMAL PARA O MARCADOR D9S171.....	63
FIGURA 08	INDIVÍDUO COM LOH TOTAL.....	64
FIGURA 09	INDIVÍDUO COM LOH PARCIAL.....	65
FIGURA 10	INDIVÍDUO COM IM.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - TIPOS HISTOLÓGICOS DOS 230 TUMORES DE MAMA ANALISADOS.....	68
TABELA 02 - CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DOS TUMORES.....	69
TABELA 03 - FREQUENCIAS DE HETEROZIGOSE NA AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO.....	70
TABELA 04 - FREQUENCIAS DE LOH E IM NOS CINCO MARCADORES MICROSSATÉLITES EM 9p.....	70
TABELA 05 - MÉDIA DE IDADE DAS PACIENTES COM E SEM LOH PARA CADA UM DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	71
TABELA 06 - FREQUENCIA DE LOH ENTRE PACIENTES COM E SEM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES.....	73
TABELA 07 - FREQUENCIA DE LOH ENTRE OS GRAUS HISTOLÓGICOS DOS TUMORES..	74
TABELA 08 - MÉDIA DO TAMANHO DO TUMOR (mm) EM PACIENTES COM E SEM LOH EM CADA MARCADOR.....	74
TABELA 09 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES CONFORME A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LOH EM CADA MARCADOR....	75
TABELA 10 - FREQUENCIA DE LOH EM PELO MENOS UM DOS MARCADORES E OS RECEPTORES HORMONAIS.....	75
TABELA 11 - FREQUENCIA DE LOH EM CADA MARCADOR E OS RECEPTORES HORMONAIS.....	75
TABELA 12 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS DE HO, HE, LOH e SEM LOH OBTIDAS, COM O TRABALHO DE PROPST (2007).....	76
TABELA 13 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS DE LOH EM 9p OBTIDAS, COM OUTROS TRABALHOS DA LITERATURA.....	77
TABELA 14 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS DE LOH E SEM LOH OBTIDAS PARA O MARCADOR D9S171, COM OUTROS TRABALHOS DA LITERATURA.....	77
TABELA 15 - GRAU DOS TUMORES, RECEPTORES HORMONAIS E AMPLIFICAÇÃO DO <i>HER2</i> QUANTO AO SUBTIPO HISTOLÓGICO.....	78
TABELA 16 - MÉDIA DOS TAMANHOS DOS TUMORES EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	79
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES CONFORME O GRAU HISTOLÓGICO.....	80
TABELA 18 - CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DOS TUMORES TRIPLO – E NÃO TRIPLO -.....	80
TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DE IDADE DAS PACIENTES CONFORME O GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR.....	81
TABELA 20 - COMPARAÇÕES ENTRE OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS COM OUTRAS AMOSTRAS JÁ DESCRITAS.....	82
TABELA 21 - COMPARAÇÕES ENTRE OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS COM OUTRAS AMOSTRAS JÁ DESCRITAS.....	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 MODELOS QUE EXPLICAM A FORMAÇÃO DO CANCER.....	14
2.2 FATORES GENÉTICOS NO CÂNCER.....	17
2.3 INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.4 ESTRUTURA NORMAL DA MAMA.....	25
2.4.1 Sistema linfático e câncer de mama.....	26
2.5 CÂNCER DE MAMA.....	27
2.5.1 Carcinoma Ductal Invasor (CDI).....	28
2.5.2 Carcinoma Ductal <i>In Situ</i> (CDIS).....	29
2.5.3 Carcinoma Lobular Invasor (CLI).....	30
2.5.4 Carcinoma Lobular <i>In Situ</i> (CLIS).....	31
2.5.5 Carcinomas de outros subtipos.....	31
2.6 CLASSIFICAÇÕES DOS TUMORES MAMÁRIOS.....	32
2.6.1 Sistema de Classificação TNM.....	32
2.6.2 Classificação Molecular do Câncer de Mama.....	35
2.7 DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO.....	36
2.8 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA.....	40
2.9 ASPECTOS GENÉTICOS EM CÂNCERES DE MAMA.....	44
2.9.1 Câncer de Mama Hereditário.....	44
2.9.2 Perda de Heterozigose (LOH).....	47
2.9.3 LOH no gene <i>CDKN2A</i>	52
3. JUSTIFICATIVA.....	56
4. OBJETIVOS.....	57
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DO TECIDO TUMORAL.....	58
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA SANGÜÍNEO E TUMORAL.....	59
5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA.....	60
5.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	61

(PCR).....	
5.5 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH).....	63
5.6 ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (MI).....	65
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	66
6. RESULTADOS.....	67
6.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DA AMOSTRA.....	67
6.2 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH) E INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (IM).....	69
6.2.1 Análises de LOH e os parâmetros clínicos.....	72
6.2.2 Análises de LOH e os parâmetros histopatológicos.....	73
6.2.3 Comparações das frequências de LOH com os dados da literatura.....	76
6.3 ANÁLISES ENTRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	77
6.3.1 Comparações dos dados histopatológicos com outros da literatura.....	81
7. DISCUSSÃO.....	84
7.1 FREQUÊNCIAS DE LOH EM 9p.....	85
7.1.1 Frequências de LOH em 9p e os parâmetros clínicos.....	90
7.1.2 Frequências de LOH em 9p e os parâmetros histopatológicos.....	91
7.2 FREQUÊNCIAS DE IM EM 9p.....	93
7.3 ANÁLISES ENTRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	94
8. CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	122

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, representando 22% de todos os cânceres femininos. A incidência anual desta doença no mundo é de cerca de um milhão de casos novos (OLDENBURG *et al.*, 2007). É também a principal causa de morte por câncer na população feminina (KALEMKERIAN *et al.*, 2006). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2008 a ocorrência de 49.400 casos novos de câncer de mama, com um risco relativo de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2008).

O câncer de mama é uma doença em que células epiteliais e estromais do tecido mamário sofrem alterações moleculares e histopatológicas que determinam a malignidade (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). A doença progride *in vivo* através de uma seqüência de estágios descritos patologicamente como hiperplasias, hiperplasias com atipia, carcinoma *in situ* (lesões pré-malignas) e carcinoma invasivo (TLSTY *et al.*, 2004).

O objetivo de muitos estudos sobre o câncer de mama é a identificação de marcadores moleculares que estejam relacionados à progressão de células normais a malignas, e que tal informação possa servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e terapêutica mais eficientes (TLSTY *et al.*, 2004).

Os principais tipos de alterações genéticas associadas ao desenvolvimento de tumores são as mutações de ganho de função, que podem resultar na ativação de proto-oncogenes, e as mutações de perda de função, associadas à inativação de genes supressores tumorais (NUSSBAUM *et al.*, 2001). Ambas determinam um descontrole do ciclo celular e a formação de um tumor.

A perda de heterozigose (LOH), que é a perda de um alelo em um loco heterozigoto, é uma das alterações mais freqüentemente observadas no câncer de mama (MYAKIS e SPANDIDOS, 2002). A análise de marcadores microssatélites polimórficos, que são seqüências de DNA na qual dois a seis nucleotídeos são repetidos numerosas vezes sequencialmente (YEE *et al.*, 1994), constitui um método útil no estudo da perda de heterozigose, através da comparação do DNA extraído do tecido normal com o DNA extraído do tecido tumoral de um mesmo indivíduo (MARTINEZ, 2006). Através da análise de LOH utilizando marcadores

microssatélites polimórficos, podemos inferir a inativação de genes supressores tumorais localizados próximos aos marcadores utilizados.

A região 9p contém vários genes supressores tumorais, e possivelmente outros ainda desconhecidos. Segundo EIRIKSDOTTIR *et al.* (1995) e BRENNER e ALDAZ (1995), 38 a 58% dos tumores de mama apresentam deleções no braço curto do cromossomo 9. O gene *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) está localizado em 9p21.3 e codifica uma proteína que age como um inibidor de quinase dependente de ciclina, atuando como um regulador negativo importante do ciclo celular. SHERR (1996) sugeriu que a importância do envolvimento da proteína *CDKN2A* em cânceres humanos é secundária apenas à da proteína *TP53* (*tumor protein p53*).

Vários estudos com carcinomas mamários analisaram a LOH em 9p, principalmente na região próxima ao gene *CDKN2A* (AN *et al.*, 1996; MARSH e VARLEY, 1998; AN *et al.*, 1999).

Baseado nas informações apresentadas, o objetivo principal deste trabalho é analisar a perda de heterozigose em marcadores microssatélites no braço curto do cromossomo 9, em carcinomas primários de mama, e verificar sua relação com o surgimento e prognóstico da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer se constitui em um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo alcançar outras regiões do corpo (metástases). Dividindo-se rápida e descontroladamente, estas células formam tumores, termo genérico que indica um aumento anormal de uma parte ou da totalidade de um tecido. Ao falarmos em tumor, podemos estar nos referindo a uma neoplasia maligna ou benigna. Neoplasia é o acúmulo anormal de células, que ocorre devido a um desequilíbrio entre proliferação e morte celular (NUSSBAUM *et al.*, 2001). Um tumor benigno corresponde a uma massa localizada de células com taxa de proliferação aumentada e que se assemelha ao tecido adjacente (células diferenciadas). Um tumor maligno geralmente apresenta maior taxa de proliferação do que o benigno, diferenciação morfológica variável (células bem diferenciadas a indiferenciadas), capacidade de invasão no tecido normal e metastatização.

Os cânceres são classificados como **sarcomas, carcinomas e câncer dos tecidos hematopoiético ou linfático**. Nos sarcomas o tumor atinge os tecidos mesenquimais (tecidos com origem no mesoderma), como tecido conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, os vasos sanguíneos e linfáticos e o tecido muscular. Os carcinomas se originam nos tecidos epiteliais, como as células que revestem o intestino e ductos mamários. Os cânceres dos tecidos hematopoiético e linfóide como leucemias e linfomas, se difundem por toda a medula óssea, sistema linfático e sangue periférico.

2.1 MODELOS QUE EXPLICAM A FORMAÇÃO DO CANCER

O modelo proposto inicialmente para a formação do câncer mostrava que os tumores malignos são clonais, onde uma célula diferenciada acumularia uma série de mutações que levariam a falta de regulação do ciclo celular e capacidade aumentada de proliferação, originando um grupo de células derivadas com as mesmas alterações, não se integrando mais ao tecido normal ao seu redor. As células cancerosas diferem das normais por várias alterações fenotípicas, como

morfologia anormal, rápida taxa de divisão e perda da inibição por contato (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

O paradigma atual da carcinogênese sugere que células epiteliais acumulem múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, levando a desorganização da morfologia do tecido e crescimento descontrolado (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). Conforme esse modelo, eventos genômicos adicionais são responsáveis por iniciar a infiltração do tumor no tecido adjacente e subsequente progressão para metástase (novos focos do tumor em locais distantes no organismo). Esta hipótese de que um evento adicional seja o responsável por iniciar a metástase relativamente tarde na tumorigênese, foi recentemente contestada por outro modelo baseado na análise da expressão gênica global de tumores de mama primários, em que grupos de genes foram reconhecidos como indicadores do desenvolvimento de metástases distantes (VAN'T VEER *et al.*, 2002). Nesse novo modelo, a tendência para desenvolver metástases é adquirida no início da tumorigênese, mas só se manifesta mais tardiamente, após a ocorrência de mutações em outros genes (BERNARDS e WEINBERG, 2002).

A transformação de células epiteliais da mama para dar origem a um tumor metastático envolve um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas e interações aberrantes com o microambiente. Nesse processo de várias etapas, o controle da proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e migração se tornam desregulados, sendo que interações aberrantes de células tumorais com células estromais podem facilitar este processo. Para formar metástases, as células tumorais devem invadir a membrana basal, entrar em um vaso sanguíneo, sobreviver na ausência de adesão, sair deste vaso e estabelecer um novo tumor em um microambiente distinto do original (VAN'T VEER e WEIGELT, 2003; WEIGELT, PETERSE e VAN'T VEER, 2005; NGUYEN e MASSAGUE, 2007).

Já foram feitas várias correlações entre as células progenitoras (tronco) de tecidos somáticos, como da mama, com as células do câncer, em aspectos como dormência, auto-renovação e diferenciação, levando os pesquisadores a propor que as células do câncer com características de tronco (células-tronco do câncer) dirigem o início, progressão e recorrência do mesmo (TAN *et al.*, 2006). Alterações genéticas e epigenéticas podem ocorrer nestas células progenitoras luminais ou basais, originando subtipos diferentes de tumores, com padrões de expressão gênica característicos e prognósticos distintos (VARGO GOGOLA e ROSEN, 2007).

Várias evidências sugerem a importância das células-tronco do câncer no desenvolvimento dos tumores. Primeiro, as células diferenciadas que compõem os tecidos epiteliais raramente se proliferam e frequentemente são repostas em linhagens epiteliais, tornando improvável que uma célula única acumule as mutações necessárias para criar um tumor. Segundo, a maior parte dos tumores é heterogênea, dificultando a hipótese de que uma célula bem diferenciada daria origem a vários tipos de células menos diferenciadas, mesmo considerando que o processo de transformação induza a certos graus de desdiferenciação. Terceiro, embora existam diversas linhagens celulares, a maior parte forma tumores em modelos experimentais apenas após a introdução de um grande número de células (MASTERS, 2000; AL-HAJJ e CLARKE, 2004 em POLYAK e HAHN, 2005), mostrando que muitas células derivadas de tumores perdem a habilidade de recriar este tipo de tumor, ao menos nos sistemas experimentais usados atualmente.

Entretanto, até o momento não foram esclarecidas as mutações presentes em células-tronco do câncer nem a relação precisa entre uma célula tronco normal e uma célula-tronco do câncer (PASSEGUE *et al.*, 2003 em POLYAK e HAHN, 2005), sendo possível que elas apenas mimetizem certos fenótipos das células tronco, não sendo células tronco verdadeiras. As células-tronco representam uma pequena fração das células que compõem um determinado tecido, sendo uma população alvo muito pequena para os eventos de transformação maligna.

Outra explicação é que as células-tronco do câncer não são as únicas a formar o tumor, mas geram células filhas menos multipotentes que constituem sua maior parte. Esta afirmação é corroborada pelo fato de que grande parte dos carcinomas é formada por células que retêm um pouco de diferenciação (PASSEGUE *et al.*, 2003; PRINDULL, 2005 em POLYAK e HAHN, 2005). Alternativamente, como as células-tronco do câncer retêm uma capacidade ilimitada de replicação, estas células podem permanecer no tecido até que um certo clone acumule um grupo de alterações genéticas suficientes para adquirir o potencial maligno total (PASSEGUE *et al.*, 2003; PRINDULL, 2005 em POLYAK e HAHN, 2005). Outra possibilidade é que células epiteliais diferenciadas sustentem as alterações genéticas que prejudicam a diferenciação, gerando as células desdiferenciadas com atributos que mimetizam o comportamento de tronco (PASSEGUE *et al.*, 2003; PRINDULL, 2005 em POLYAK e HAHN, 2005). Existem evidências circunstanciais que apóiam todas estas afirmações, e é possível que

tipos particulares de tumor surjam a partir de cada uma delas (POLYAK e HAHN, 2005).

2.2 FATORES GENÉTICOS NO CANCER

Sem levar em consideração se é esporádico ou hereditário, o câncer é considerado uma doença genética. Uma vez iniciado, se desenvolve pelo acúmulo de mutações adicionais, ou pelo silenciamento epigenético de genes envolvidos na proliferação celular ou reparo de danos no DNA. Vários tipos de genes estão envolvidos em iniciar o processo carcinogênico, por exemplo, os que codificam: 1) proteínas que atuam na sinalização de vias para a proliferação celular; 2) componentes do citoesqueleto responsáveis em manter a inibição por contato entre as células; 3) reguladores do ciclo mitótico; 4) componentes da maquinaria de morte celular programada (apoptose); 5) proteínas responsáveis em detectar e reparar mutações no DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2001).

Diferentes tipos de mutações são responsáveis por causar o câncer. Algumas podem ser transmitidas pelos genitores através da linhagem germinativa, outras surgem *de novo* na linhagem de células somáticas de certo tipo celular (GRIFFITHS *et al.*, 2002). Os principais tipos são as mutações de ganho ou perda de função e as translocações cromossômicas. Nas mutações de ganho de função a proteína mutante adquire novas características, como ocorre na ativação de **oncogenes**, em que a proteína codificada (oncoproteína) geralmente tem sua função aumentada. Nas mutações de perda de função ocorre a perda de função de ambos os alelos de um gene (por mutação, deleção ou silenciamento epigenético), e a proteína resultante não é sintetizada, ou é sintetizada em uma taxa pequena, insuficiente para desempenhar sua função biológica. Um exemplo são as mutações em ambos os alelos de um **gene supressor de tumor**. As translocações cromossômicas podem alterar a expressão de alguns genes ou criar genes quiméricos cujas proteínas ganham novas propriedades (NUSSBAUM *et al.*, 2001).

Os oncogenes são alelos mutados de uma classe de genes conhecida como proto-oncogenes, que realizam processos relacionados à diferenciação e proliferação celular. Em condições fisiológicas normais, a proliferação celular pode ser explicada através das seguintes etapas: a) ligação de um fator de crescimento

ao seu receptor específico na membrana celular; b) ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento, ativando proteínas transdutoras de sinais na parte interna da membrana plasmática; c) transmissão do sinal amplificado do citoplasma para o núcleo através de mensageiros secundários; d) indução e ativação de fatores reguladores nucleares que iniciam a transcrição do DNA; e) entrada e progressão da célula no ciclo celular. Os oncogenes codificam oncoproteínas que são versões alteradas das proteínas normais, e podem descontrolar a proliferação celular interagindo em qualquer fase do processo citado acima (WEINBERG, 1985).

Os proto-oncogenes são transformados em oncogenes através de duas grandes categorias de alterações: as que afetam a estrutura do gene, resultando na síntese de um produto gênico anormal, e as que afetam a regulação da expressão gênica, resultando no aumento da produção da proteína. Um único alelo mutado é capaz de alterar o fenótipo da célula normal para maligno, seja por translocações cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto (KNUDSON, 1985). Uma célula tumoral será tipicamente heterozigota para uma mutação oncogênica e seu alelo normal. Os oncogenes podem determinar a formação de um tumor pelo estímulo anormal da divisão celular e proliferação, aumento do fluxo sanguíneo para o tumor ou inibição da apoptose (NUSSBAUM *et al.*, 2001; GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Um dos primeiros oncogenes ativados descobertos foi o gene mutante *RAS*, derivado de uma linhagem celular de carcinoma de bexiga. O proto-oncogene *RAS* codifica uma proteína da família das proteínas G (proteínas envolvidas na transdução de sinais), que quando ligadas a GTP ativam uma cascata de eventos de fosforilação de proteínas quinases, levando a expressão de genes que estimulam o ciclo celular. Em um ambiente de proliferação normal, a proteína *RAS* só vai estar ligada a GTP na presença de fatores de crescimento externos na célula. A alteração neste gene, devido a uma mutação de ponto, sintetiza uma proteína *RAS* anormal que sinaliza continuamente, mesmo na ausência da ligação a GTP e de fatores de crescimento, estimulando o crescimento celular (FIGURA 01) (NUSSBAUM *et al.*, 2001).

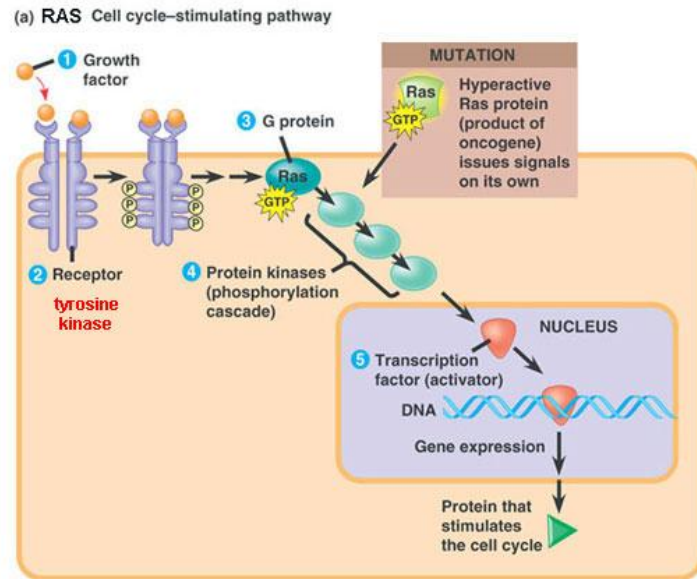


FIGURA 01 - MECANISMO DE AÇÃO DO ONCOGENE RAS

FONTE – Molecular Genetics – DNA, RNA & Proteins. Disponível em

fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm (acessado em 30/08/2008)

LEGENDA: em um ambiente celular normal, fatores de crescimento que se ligam a um receptor com atividade de tirosina quinase provocam sua hiperfosforilação, que leva à ativação da proteína RAS através da ligação a uma molécula de GTP. Uma vez ativa, a RAS leva ao aumento da expressão de genes relacionados à proliferação celular através de uma cascata de fosforilação de proteínas tirosina quinases. Quando mutado, o oncogene RAS fica ativo constantemente, acentuando a proliferação celular e podendo levar à formação de um tumor.

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular através do retardo na progressão do ciclo celular e bloqueio da diferenciação, ou induzindo a morte celular programada. Os produtos protéicos dos genes supressores de tumor podem ser moléculas que regulam a transcrição e o ciclo celular, como a proteína TP53, moléculas que regulam a transdução de sinais, como o produto do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), receptores de superfície celular, como o gene *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*) no carcinoma de cólon (“*gatekeepers*”), genes que regulam a apoptose e genes envolvidos no reparo do DNA (“*caretakers*”). Alterações que levam a uma inativação destes genes liberam a célula da inibição nos pontos de checagem do ciclo celular, levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). São necessários os dois alelos alterados para que ocorra a perda de função do gene, e a célula tumoral não terá nenhuma cópia do alelo selvagem correspondente (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

A relação entre genes supressores de tumor e o câncer foi inicialmente proposta na década de 70, quando A. G. Knudson elaborou a hipótese dos dois

eventos (“*Two Hits Model*”) para explicar a ocorrência esporádica e familiar do retinoblastoma, um raro câncer intra-ocular da infância (KNUDSON, em NUSSBAUM *et al.*, 2001). No retinoblastoma o gene *RB1*(*retinoblastoma 1*) está mutado. Ele se localiza em 13q14.2 e codifica a proteína RB, que atua ligando-se ao fator de transcrição E2F, e impedindo a transcrição de genes necessários para a entrada na fase S do ciclo celular. Se a proteína RB está inativada, a célula entra na fase S do ciclo celular, não ocorrendo o bloqueio das células anormais ao final de G1. As células da retina sem o gene *RB1* funcional proliferam descontroladamente, e a criança apresenta um ou alguns tumores em um dos olhos. Esta é a condição esporádica, sem história da doença na família. Alguns pacientes, entretanto, apresentam a forma herdável da doença, o retinoblastoma binocular hereditário (RBH). Neste caso, os tumores podem aparecer nas retinas de ambos os olhos e geralmente mais precocemente (FIGURA 02). A transmissão do RBH ocorre de forma autossômica dominante, e na presença de uma mutação na linhagem germinativa que inativa uma das cópias do *RB1*, a taxa de mutação para este gene torna virtualmente certo que em algumas células da retina o outro alelo *RB1* normal também será mutado, produzindo células sem a proteína RB funcionais (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

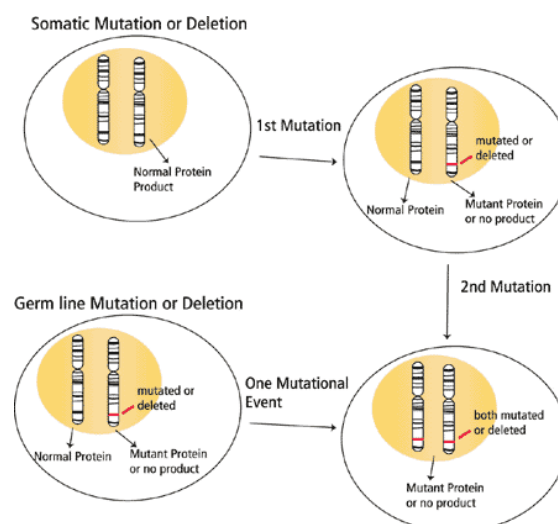


FIGURA 02 - MODELO DE INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR

FONTE - Tumor suppressor gene inactivation or deletion. Disponível em www.sigmaaldrich.com (acessado em 30/08/2008)

LEGENDA: Para que um tumor possa se desenvolver, os dois alelos de um gene supressor de tumor devem ser inativados. Em síndromes de câncer familiar, um alelo mutado de um gene supressor de tumor é herdado e presente em todas as células do indivíduo (por exemplo, RBH). Entretanto a tumorigênese só se inicia quando o segundo alelo é inativado em uma célula somática. Em tumores esporádicos (por exemplo, retinoblastoma esporádico), a inativação dos dois alelos ocorre na via somática por mutação ou deleção.

Através do estudo de polimorfismos de DNA na região próxima ao gene *RB1*, foi observado que indivíduos com retinoblastoma heterozigotos nos tecidos normais tinham tumores com alelos de apenas um dos dois cromossomos 13, revelando uma perda de heterozigose (LOH) na região do gene *RB1* (13q). Nos casos familiares, o cromossomo que permanece sem a perda alélica é o herdado com a mutação no gene. Portanto, a LOH geralmente representa a perda do alelo remanescente e normal em heterozigotos. Ela pode ocorrer por deleção intersticial, recombinação mitótica ou não disjunção dos cromossomos durante a divisão celular. O mecanismo descrito para o retinoblastoma se aplica a outros genes supressores de tumor, e este modelo foi importante para explicar outros tipos de cânceres familiares, como o câncer de mama familiar. A perda de heterozigose também é observada em vários outros tumores, esporádicos ou familiares, e é considerada uma evidência da existência de genes supressores de tumor, mesmo que ainda desconhecidos.

A análise de marcadores microssatélites, que são seqüências de DNA na qual dois a seis nucleotídeos são repetidos numerosas vezes sequencialmente (YEE *et al.*, 1994), é um método bastante útil no estudo da perda de heterozigose, principalmente devido ao fato de serem altamente polimórficos, com muitos locos heterozigotos. O número de repetições de microssatélites pode variar entre os indivíduos, motivo pelo qual são consideradas como as impressões digitais do DNA de cada um e são utilizadas em exames para verificação de paternidade.

Os produtos de muitos genes supressores de tumor vêm sendo isolados e caracterizados, como as proteínas RB1 (codificada pelo gene *RB1*), BRCA1 e BRCA2, codificadas pelos genes *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*), já que eles agem naturalmente como uma proteção ao câncer. Espera-se que entendendo melhor estes genes e suas respectivas proteínas, possamos melhorar os métodos terapêuticos contra o câncer.

2.3 INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA

Para o estabelecimento de medidas efetivas de controle do câncer, fazem-se necessárias informações de qualidade sobre sua distribuição de incidência e mortalidade. Os dados sobre a mortalidade por câncer no âmbito nacional têm sido

amplamente utilizados como alternativa viável frente à realidade das informações sobre incidência não serem representativas do país.

PARKIN *et al.* (2001) estimaram para o ano 2000 uma incidência de dez (10) milhões de casos de câncer em todo o mundo, dentre os quais 53% ocorrendo nos países em desenvolvimento. Os tumores de pulmão (902 mil casos novos) e próstata (543 mil casos novos) foram os mais frequentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino os mais frequentes foram os tumores de mama (um milhão de casos novos) e colo do útero (471 mil novos casos). JEMAL *et al.* (2007) estimaram para o ano de 2007, 1.444,920 casos novos de câncer nos Estados Unidos, e 559.600 mortes. Os três tipos de câncer mais comuns entre as mulheres foram os da mama, pulmão/brônquios e cólon/reto, correspondendo a 52% de todos os casos.

Segundo dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), para os anos de 2008 – 2009 são esperados 466.730 novos casos de câncer no Brasil. Os mais incidentes, com exceção do câncer de pele não-melanoma, estariam de acordo com as estimativas de PARKIN *et al.* para o ano 2000, sendo o câncer de próstata e pulmão os mais ocorrentes entre o sexo masculino, e o câncer de mama e de colo do útero os mais ocorrentes entre o sexo feminino. Estes dados também corroboram a versão antiga da Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil publicada pelo INCA em 2006 (INCA, 2006).

Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. Em comparação com as estimativas descritas por PARKIN *et al.* (2001) para o ano 2000, ocorrerá um aumento da ocorrência de 7% nos países em desenvolvimento, que pode ser explicada pela ocidentalização dos hábitos e melhora no diagnóstico precoce da doença. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderia ser prevenido (INCA, 2008).

Mais especificamente para o câncer de mama, JEMAL *et al.* (2007) estimaram 180.510 casos novos para o ano de 2007 nos Estados Unidos, e 40.910 mortes, correspondendo a 26% do total de casos de câncer em mulheres, e 15% das mortes, respectivamente. Estima-se que a incidência anual de casos novos de câncer de mama seja cerca de um milhão no mundo (PARKIN *et al.*, 1999; PARKIN,

2004), tendo aumentado drasticamente nos últimos 25 anos (WEAVER *et al.*, 2005), principalmente devido a melhora no diagnóstico da doença.

Os dados do INCA para os anos de 2008 – 2009 apontam 49.400 casos novos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sul do Brasil este é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres (sem considerar os tumores de pele não-melanoma), com 67 casos a cada 100 mil mulheres. Mais especificamente no Estado do Paraná, são estimados 3.010 casos novos, sendo 700 em Curitiba.

Apesar do aumento na incidência de novos casos, a mortalidade por carcinoma de mama vem diminuindo 2,3% ao ano desde 1990 (JEMAL *et al.*, 2004), devido principalmente às melhorias na detecção e tratamento da doença.

O câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, sendo que as taxas de incidência padronizadas por idade são cerca de três vezes maiores nos países desenvolvidos (FERLAY *et al.*, 2001). É observada uma diferença significativa nas taxas de incidência do câncer de mama entre as chamadas áreas de baixo risco, como o extremo leste da Ásia, África e Américas Central e do Sul (menos Uruguai e Argentina), e as áreas de alto risco, como América do Norte, Norte e Oeste da Europa, Austrália, Nova Zelândia, Uruguai e Argentina. Juntos, Estados Unidos e Europa têm aproximadamente 16% da população mundial, e 60% dos casos de câncer de mama de todo o planeta (PARKIN *et al.*, 1999; PARKIN, 2004). Atualmente, o risco para o câncer de mama tem aumentado consideravelmente nos países em desenvolvimento. Acredita-se que esta tendência seja resultado da ocidentalização do estilo de vida em fatores como hábitos alimentares, obesidade, sedentarismo, exposição ao estrogênio exógeno, gravidez tardia e planejamento familiar (que resulta em menor número de filhos), aproximando-se dos padrões dos países desenvolvidos (BRAY *et al.*, 2004). Estudos com imigrantes demonstram que a incidência desta doença aumenta em pessoas que se deslocam de uma região de baixo risco para outra de alto risco, descartada a miscigenação entre os indivíduos. Este efeito é passado para a próxima geração, e os descendentes adquirem o risco de câncer de mama da população para a qual emigraram em uma ou duas gerações (ZIEGLER *et al.*, 1993; KLIEWER e SMITH, 1995). Alguns exemplos são o aumento do risco relativo em indivíduos asiáticos (baixo-risco) que migraram para os Estados Unidos (alto-risco) (ZIEGLER *et al.*, 1993), e em imigrantes de alguns países

europeus de baixo-risco, como Polônia e Itália, que migraram para a Austrália (GEDDES *et al.*, 1993; TYCZYNSKI *et al.*, 1994). Este fenômeno corrobora a importância crucial dos fatores ambientais para o risco de câncer de mama.

As diferentes taxas de mortalidade em todo o mundo refletem, em parte, as condições de saúde da população em questão. Países e cidades com um sistema de saúde melhor, mais moderno e organizado têm condições de realizar o diagnóstico precoce da doença. Os avanços atuais na terapia do câncer contribuíram consideravelmente para a melhora na sobrevivência e redução da mortalidade. Em quase todos os países foi observado um aumento nas taxas de mortalidade entre as décadas de 50 e 80, particularmente no leste e sul da Europa. O declínio da mortalidade se tornou evidente a partir de 1990, embora esteja restrito a mulheres com menos de 50 anos (BRAY *et al.*, 2004).

No Brasil, entretanto, a mortalidade proporcional por neoplasias cresceu consideravelmente ao longo das últimas décadas, acompanhando o crescimento da mortalidade relacionada às doenças do aparelho circulatório e por causas externas, ao mesmo tempo em que diminuíram as mortes por doenças infecto-parasitárias – esse perfil da mortalidade retrata a transição epidemiológica e demográfica verificada em nosso país. Em 2004, a mortalidade por câncer representou 13,7% de todos os óbitos registrados no país, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório, cujo percentual chegou a 27,9%. Entre as mulheres, as neoplasias aparecem em segundo lugar, com 15,1%. Os tumores da mama foram a 7ª causa de morte entre as mulheres (INCA, 2004). Para o ano de 2006, as regiões do Brasil com maior incidência de câncer de mama foram o Sudeste e Sul, com aproximadamente 70 casos novos a cada 100 mil mulheres. Já a região Norte apresentou a menor incidência, com 15 casos novos a cada 100 mil mulheres. Apenas na região Norte outro tipo de câncer – o de colo do útero – foi o mais freqüente no sexo feminino, com 21 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2006). Para os anos de 2008 – 2009, a estimativa por estado no Brasil é de 50 casos a cada 100 mil mulheres, e nas capitais de 76 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008), corroborando a hipótese de que hábitos de vida modernos e industrializados são importantes fatores de risco para o câncer de mama.

2.4 ESTRUTURA NORMAL DA MAMA

A mama feminina é composta principalmente por lóbulos, que são glândulas produtoras de leite, ductos, que são finos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo, e estroma, formado por tecidos gordurosos e conectivos, vasos sanguíneos e linfáticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

As várias ramificações dos grandes ductos distais dão origem aos ductos terminais. Cada lóbulo é composto por um ducto terminal e seus ácinos. Até a puberdade, o sistema de ductos ramificados termina em fundo cego, quando ocorrem proliferações distais, originando os lóbulos. A maior parte do estroma da mama consiste em tecido conjuntivo denso misturado com tecido adiposo, o estroma interlobular, que contém fibras elásticas que dão sustentação aos ductos (FIGURA 03). Já os lóbulos estão contidos em estroma mixomatoso frouxo, hormonalmente responsivo, o estroma intralobular.

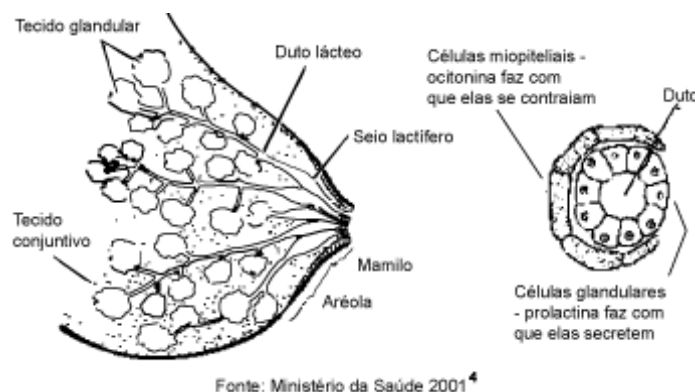


FIGURA 03 – ANATOMIA DA MAMA FEMININA
 FONTE – Ministério da saúde (2001)

A mama sofre algumas modificações a cada ciclo menstrual. Na fase folicular (primeira metade) os lóbulos são quiescentes. Após a ovulação, a proliferação celular e o número de ácinos por lóbulo aumentam, sob influência dos níveis crescentes dos hormônios estrogênio e progesterona, gerando edema lobular. Quando ocorre a menstruação, e com a queda dos níveis destes dois hormônios, ocorre o desaparecimento do edema do estroma, infiltração linfocítica e regressão do tamanho dos lóbulos.

Somente com o início da gravidez é que a mama assume sua maturação morfológica e atividade funcional completa. A partir de cada ducto terminal desenvolvem-se numerosas glândulas secretoras, aumentando significativamente a quantidade de estroma em relação à de epitélio na mama. Após o nascimento começa a secreção de leite. Após a lactação os lóbulos regridem e sofrem atrofia, diminuindo o tamanho total da mama. Após a terceira década de vida os ductos e lóbulos atrofiam, havendo redução do estroma inter e intralobular. O estroma interlobular (radiodenso) é substituído por tecido adiposo (radiotransparente). As neoplasias mamárias geralmente não contêm tecido adiposo, por isso a mamografia é menos sensível em mulheres jovens, já que não há o contraste entre o tecido denso circulante e o tumor.

2.4.1 Sistema linfático e câncer de mama

O sistema linfático é uma das principais vias pelas quais o câncer de mama pode formar metástases loco - regionais. Ele é composto por várias partes. Os linfonodos são pequenos agrupamentos de células do sistema imune conectados entre si por vasos linfáticos. Estes vasos carregam a linfa, um fluido com produtos tóxicos do biometabolismo mamário e células imunes, para fora da mama. É comum as células cancerosas da mama entrarem nos vasos linfáticos e iniciarem o crescimento de um novo tumor nos linfonodos. A maior parte dos vasos linfáticos da mama se conecta aos linfonodos axilares, alguns aos linfonodos da região peitoral (linfonodos da mama interna) e outros aos linfonodos supraclaviculares ou infraclaviculares (FIGURA 04). É importante que seja avaliada a presença de metástases nestes linfonodos, pois há uma chance aumentada de que estas células atinjam a corrente sanguínea e formem pontos de metástase à distância. Quanto mais linfonodos estiverem comprometidos, maior a chance. Entretanto, nem todas as mulheres com células tumorais em seus linfonodos vão formar metástases à distância, e em alguns casos mulheres com linfonodos negativos podem vir a desenvolver metástases (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

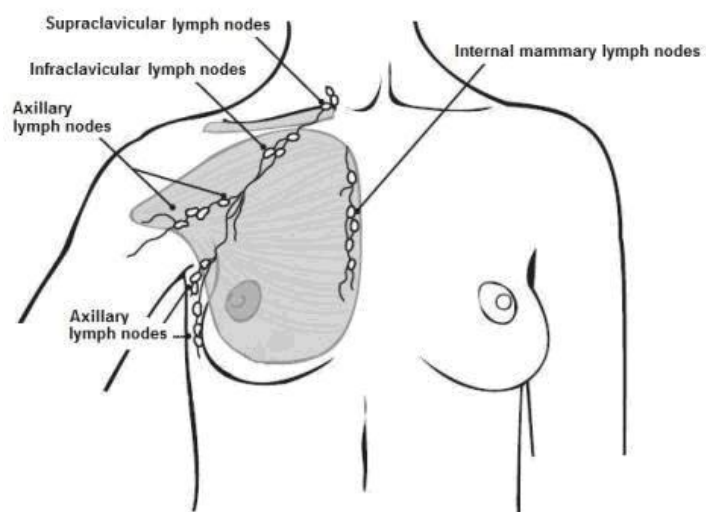


FIGURA 04 – LINFONODOS MAIS COMUNS QUE APRESENTAM METÁSTASES MAMÁRIAS
 FONTE – *American cancer society*, disponível em:
http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_is_breast_cancer_5.asp?sitearea=

Atualmente, devido à elevada taxa de morbidade em mulheres que fazem o esvaziamento axilar na busca de metástases nos linfonodos axilares, têm-se optado em fazer a biópsia do linfonodo sentinela (LS), e apenas se esta for positiva para células tumorais, faz-se o esvaziamento completo da axila. O conceito de biópsia do linfonodo sentinela é baseado na observação de que a mama dirige a sua drenagem para o primeiro linfonodo da cadeia linfática (sentinela), e deste para os outros linfonodos regionais. Se o linfonodo sentinela é identificado (através de técnicas de coloração durante a cirurgia de retirada do tumor) e removido cirurgicamente da axila para análise histopatológica, o seu estado refletirá o estado dos outros linfonodos axilares, com acurácia maior que 95% (SINGLETARY, 2001).

2.5 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença em que células epiteliais e estromais colaboram para gerar a malignidade. *In vivo*, acredita-se que a doença progride através de um contínuo de estágios descritos por patologistas (FIGURA 05). As primeiras lesões visíveis são as hiperplasias, em que as células epiteliais apresentam alterações estruturais, mas não atipia citológica, com poucas alterações genéticas. Na hiperplasia ductal com atipia, as células apresentam atipia citológica,

entretanto o número de alterações genéticas é pequeno. À medida que a doença progride para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia citológica é mais proeminente, com aumento significativo do índice mitótico e das alterações genéticas. O que define a forma pré-maligna (CIS) da maligna (CI) é quando as células epiteliais da mama rompem os limites da membrana basal e invadem o estroma circundante (TLSTY *et al.*, 2004).

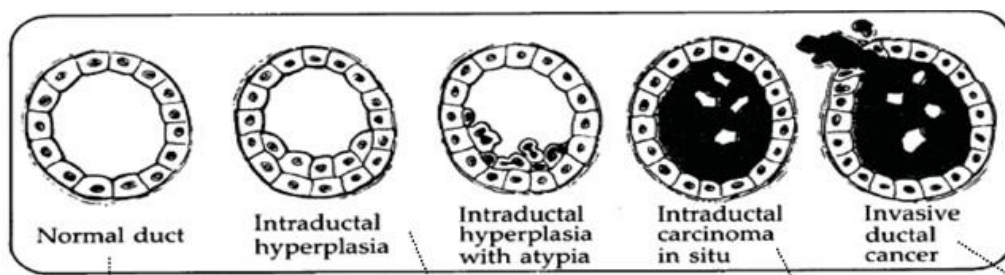


FIGURA 05 – PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA
 FONTE – TLSTY *et al.* (2004)

Os adenocarcinomas são os tumores malignos da mama mais comuns. É um tipo geral de câncer que aparece em qualquer tecido glandular, podendo ser *in situ* ou invasivos, ductais, lobulares ou de outros subtipos.

2.5.1 Carcinoma Ductal Invasor (CDI)

O carcinoma ductal invasor (CDI) representa 80% a 90% dos carcinomas da mama. Seu diagnóstico é feito por exclusão, quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinomas mamários, sendo classificado como carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE). Ele é o tumor mamário mais freqüente, sendo que a cada 10 cânceres invasivos da mama, oito são do tipo CDI. Ocorre na região do segmento ductolobular terminal da mama e é definido como um câncer que cresceu além da camada de células na qual teve origem. O CDI se inicia em um ducto da mama, encontra a parede do ducto e se espalha para o tecido gorduroso do estroma. Geralmente aparece como um nódulo pequeno e assintomático, identificado apenas por mamografia.

Os exames macroscópicos após excisão do tumor mostram um tecido firme e pálido, com consistência de areia (BATEMAN, 2004). Histologicamente, o tumor é

formado pela proliferação de elementos epiteliais com atipias citológicas relativamente acentuadas, com uma tendência diversa a formar estruturas pseudoglandulares ou semelhantes aos ductos, e com atividade mitótica variável. A avaliação histológica destas características (formação de túbulos, atipias nucleares e índice mitótico) serve para graduar o CDI: bem diferenciado (GI), de médio grau de diferenciação (GII) e pouco diferenciado (GIII). É freqüente a associação com um componente intraductal (em geral, de mesmo grau) com extensão variável. Denomina-se componente intraductal extenso (CIE) quando este constitui pelo menos 25% de toda área ocupada pela neoplasia, correlacionado com maior ocorrência de recidivas locais após cirurgia conservadora da mama.

Apresenta grandes chances de formar metástases em outros órgãos, através da corrente sanguínea ou linfática.

2.5.2 Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS)

O Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS), também conhecido como carcinoma intraductal, é o tipo mais comum de carcinoma não-invasivo, e representa um grupo heterogêneo de lesões pré-invasivas com diferentes padrões histológicos, taxas de crescimento e características citológicas (ELLSWORTH *et al.*, 2007). Ocorre uma proliferação das células do epitélio ductal maligno que não invade o tecido normal (OREL *et al.*, 1997), sendo limitado pela membrana dos ductos, embora o processo possa se estender até os lóbulos. Pode ocorrer isolado ou em associação com o carcinoma invasivo. Pode apresentar uma variedade de padrões de crescimento microscópico e de graus histológicos, sendo que o CDIS de alto grau é o mais comum em associações com o carcinoma invasivo. Não apresenta propensão à metástases, e geralmente é curável através de excisão cirúrgica (BATEMAN, 2004).

A incidência do CDIS aumentou dramaticamente nos últimos 30 anos, de 1% a aproximadamente 20% de todos os cânceres de mama diagnosticados (ELLSWORTH *et al.*, 2007). Dados da *AMERICAN CANCER SOCIETY* (2008) mostram que cerca de 1 a cada 5 casos novos de câncer de mama vão ser do tipo CDIS.

O CDIS pode ser dividido histologicamente em subtipos:

- Tipo comedocarcinoma - apresenta detritos necróticos celulares preenchendo os espaços ductais.
- Tipo micropapilar - caracteriza-se por projeções papilares homogêneas.
- Tipo cribriforme - apresenta espaços glandulares nítidos e marcados. Possui mitoses infreqüentes e, eventualmente, ocorre algum grau de necrose limitada a poucas células.
- Tipo sólido - apresenta o lúmen ocupado por uma proliferação de células de tamanho médio, menores que as do tipo comedocarcinoma e maiores do que as encontradas no carcinoma lobular *in situ*.

Em termos de prognóstico, quanto maior o tamanho e o grau de necrose da lesão, maior o seu potencial para tornar-se invasora. As lesões do tipo comedocarcinoma apresentam prognóstico menos favorável comparado aos outros tipos histológicos. Aproximadamente 25% a 30% das lesões *in situ* não-tratadas desenvolvem carcinoma invasor nos próximos 10 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

2.5.3 Carcinoma Lobular Invasor (CLI)

O Carcinoma Lobular Invasor (CLI) representa de 5 a 15% de todos os carcinomas de mama diagnosticados, e tem uma propensão a multifocalidade (14 a 31%). Apresenta um padrão histológico único de invasão no tecido normal, e baixa densidade das lesões, o que dificulta a identificação por mamografia e sonografia (WEISTEIN *et al.*, 2001; QAYYUM *et al.*, 2002). A idade média ao diagnóstico varia de 45 a 56 anos. A maioria das pacientes apresenta apenas um adensamento ou um endurecimento local mal definido, por vezes, surgindo como uma nodularidade palpável. Em lesões avançadas, pode haver retração da pele e fixação. Em geral, as calcificações não estão presentes na lesão, mas podem aparecer em lesões benignas adjacentes. A bilateralidade é descrita em 6% a 28% dos casos.

Histologicamente, a lesão caracteriza-se pela presença de células tumorais pequenas e homogêneas, e crescem em "fila indiana" com um padrão concêntrico. Essa lesão apresenta mucina intracelular e não deve ser confundida com o carcinoma mucinoso, que possui prognóstico bastante favorável. Em muitos casos, é possível identificar um componente de carcinoma lobular *in situ*. O prognóstico é

semelhante ao CDI-SOE, sendo que o tamanho tumoral e o *status* axilar são os fatores prognósticos mais importantes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

2.5.4 Carcinoma Lobular *In Situ* (CLIS)

A incidência do carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é baixa, representando em vários estudos 0,5 a 3,6% dos espécimes de biópsias de mama presumivelmente benignos. Clinicamente não é palpável e não é distinguível da mama normal por mamografia ou ultra-sonografia (HEYWANG *et al.*, 1997). A idade média no diagnóstico é de 45 anos, e 80 a 90% dos casos ocorrem em mulheres na pré-menopausa. Essas lesões têm reconhecida tendência à multifocalidade, sendo que a bilateralidade ocorre em aproximadamente 25% dos casos. A evolução do CLIS pode ser bastante variável. Aproximadamente 20 a 30% das pacientes apresentarão desenvolvimento de carcinoma infiltrante em 15 anos, sendo 50% em cada mama, 75% do tipo ductal invasor e 25% lobular invasor. Baseada nessa evolução, tal lesão é reconhecida como um marcador tumoral, embora alguns autores, recentemente, também lhe tenham atribuído um caráter precursor (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

2.5.5 Carcinomas de outros subtipos

Há ainda outros tipos de carcinomas menos freqüentes.

- Carcinoma Mucinoso – também conhecido como colóide, corresponde de 1 a 7% dos casos de câncer de mama diagnosticados. Caracteriza-se pela presença de secreção mucinosa abundante no tumor (quase totalmente extracelular), sendo que a quantidade relativa de mucina e de estroma determina a consistência da lesão, que pode ser macia, gelatinosa ou firme. Geralmente ocorre em mulheres com idade mais avançada e tem um prognóstico melhor que o CDI (MEMIS *et al.*, 2000). É considerado um tumor de bom prognóstico.
- Carcinoma Medular – representa até 7% dos carcinomas de mama e ocorre principalmente em mulheres com menos de 35 anos. Macroscopicamente,

são tumores bem-delimitados, circunscritos, densos com 2 a 3 cm de diâmetro, acinzentados, com consistência firme. O prognóstico é relativamente favorável.

- Carcinoma Tubular – é um tipo especial de CDI, constituindo 2% dos carcinomas de mama. Incidem em mulheres relativamente jovens, entre 44 e 49 anos. Geralmente, apresenta-se como tumor pequeno, dificilmente ultrapassando 4 cm. A lesão é composta por proliferação de túbulos glandulares, de forma irregular, revestidos por uma única fila de células bem diferenciadas, freqüentemente apresentando secreção apócrina. O prognóstico é extremamente favorável.
- Carcinoma Papilífero - constitui de 1% a 2% dos carcinomas mamários e caracteriza-se por uma arquitetura papilar do componente invasor e do intraductal. Ocorre mais freqüentemente nas mulheres idosas (idade média entre 63 e 67 anos). O tumor é circunscrito, podendo ser lobulado e com um diâmetro médio de 3 cm ao diagnóstico; às vezes, apresenta componente cístico. Tem crescimento lento, podendo, em alguns casos, comprometer toda a mama, principalmente quando for cístico e invadir a pele.
- Carcinoma Metaplásico - forma rara de câncer, algumas vezes de evolução rápida, de prognóstico incerto, representando menos de 5% dos cânceres de mama.

2.6 CLASSIFICAÇÕES DOS TUMORES MAMÁRIOS

2.6.1 Sistema de Classificação TNM

O Sistema de Classificação de Tumores Malignos (TNM) foi desenvolvido por Pierre Denoix (França), entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1952). A prática de se dividir os casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu do fato de que as taxas de sobrevida eram maiores para os casos nos quais a doença era localizada do que para aqueles nos quais a doença tinha se estendido além do órgão de origem. O sistema TNM trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença, determinada clínica e

histopatologicamente quando possível (TNM: CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS, 2004). Este sistema tem por base a avaliação de três componentes: **T** - extensão do tumor primário, **N** - ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e **M** - ausência ou presença de metástases à distância. São adicionados números a estes componentes indicando a extensão da doença maligna (T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0, M1, etc.). A classificação patológica, designada **pTNM**, complementa a classificação clínica e tem por base as evidências obtidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pela evidência adicional obtida através da cirurgia e do exame histopatológico.

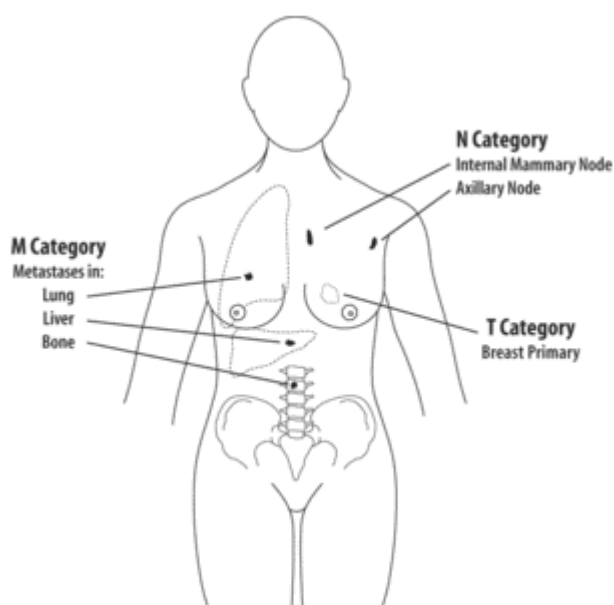


FIGURA 06 – CLASSIFICAÇÃO TNM

FONTE: UICC (2009), disponível em:

http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=14296&Itemid=428

A descrição clínica precisa e a classificação histopatológica das neoplasias malignas são importantes para diversos objetivos, como: auxiliar o médico no planejamento do tratamento; dar indicações do prognóstico; ajudar na avaliação dos resultados de tratamento; facilitar a troca de informações entre os centros de tratamento e contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer em humanos. Existem muitos modos de classificação dos tumores, como a localização anatômica e a extensão clínica e patológica da doença, a duração dos sinais ou sintomas, o gênero e idade do paciente, o tipo e grau histológico. Todas essas bases representam variáveis que têm uma influência na evolução da doença.

Para os tumores de mama, a classificação é aplicável somente para carcinomas, tanto para mama feminina quanto masculina. Deve haver confirmação histológica da doença. No caso de tumores primários múltiplos sincrônicos em uma mesma mama, o tumor com a maior categoria T deve ser usado para a classificação. Os cânceres de mama, bilaterais e simultâneos, devem ser classificados independentemente para permitir a divisão dos casos por tipo histológico. Os procedimentos para avaliação das categorias T, N e M são os seguintes: Categoria T - Exame físico e diagnóstico por imagem, p. ex., mamografia; Categoria N - Exame físico e diagnóstico por imagem; Categoria M - Exame físico e diagnóstico por imagem.

Para a classificação clínica dos tumores de mama, as seguintes definições gerais são utilizadas:

T – Tumor primário

TX - O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

Tis – Carcinoma *in situ*

T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão (dividido em T1mic, T1a, T1b e T1c, conforme o tamanho).

T2 - Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão

T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão

T4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele (dividido em T4a, b, c, d)

N - Linfonodos Regionais

NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral (ais), móvel(eis)

N2 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es) (dividido em N2a e N2b)

N3 - Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s)

supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s) (dividido em N3a, b, c)

M - Metástase à Distância

MX - A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Metástase à distância (seguida da notação conforme a localização da metástase)

2.6.2 Classificação Molecular do Câncer de Mama

PEROU *et al.* (2000) foram os primeiros a avaliar padrões de expressão gênica no câncer de mama, usando 42 amostras de tumores mamários (36 carcinomas ductais invasores, 2 carcinomas lobulares, 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 amostras de mama normal) e focando a análise em 1753 genes com expressão altamente variada. Eles propuseram que a diversidade fenotípica do câncer de mama deve ser acompanhada por uma correspondente diversidade na expressão gênica, e com base nos resultados obtidos, sugeriram uma classificação em quatro grupos: subtipos luminal; basal; *HER2* positivo e semelhante ao normal. Em um trabalho subsequente com 78 tumores, SORLIE *et al.* (2001) confirmaram os achados iniciais, alterando a lista de genes (476 genes) e adicionando três novos subgrupos ao subtipo luminal: luminal-A; B e C. O subgrupo luminal – A tem maior expressão de RE e genes regulados pelo receptor de estrogênio e um melhor desenvolvimento clínico quando comparado ao luminal – B (LOI, 2008). Em um terceiro estudo, os mesmos pesquisadores (SORLIE *et al.*, 2003) utilizaram uma versão modificada do grupo de genes, incluindo 534 genes, que foram testados em 115 pacientes. Os subtipos basal, *HER2* positivo, semelhante ao normal e dois subgrupos luminais (A e B) foram novamente identificados.

Estudos com outros grupos de pesquisa mostraram diferenças em larga escala na expressão de genes entre tumores RE+ e RE-, sugerindo que outros subgrupos moleculares devam existir em adição ou dentro das categorias já propostas (PUSZTAI *et al.*, 2003 e SOTIRIOU *et al.*, 2003). Os tumores luminais são positivos para o RE e genes regulados por este gene mostram níveis elevados de

expressão. Os tumores basais são negativos para a expressão do RE, e a expressão de citoqueratinas basais está aumentada (LOI, 2008).

Além de proporem uma classificação molecular para os tumores de mama, estes trabalhos também indicaram características moleculares específicas para cada subtipo e determinaram que os tumores basais e luminais devem surgir a partir de células diferentes. PEROU *et al.* (2000) mostraram que os tumores basais compartilham algumas características moleculares com as células mioepiteliais, e os tumores luminais compartilham características moleculares com as células luminais.

Os portadores de tumores luminais A são os que apresentam maior sobrevida, embora sejam menos sensíveis à quimioterapia (ROUZIER *et al.*, 2005). O oncogene *ERBB2* ou *HER2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2*) está amplificado em tumores *HER2* positivos, mas não nos outros subtipos, e genes regulados pelo RE estão super-regulados nos tumores luminais – A comparado com os outros subgrupos. Nos tumores basais, foram descritas mutações tanto no *BRCA1* quanto no *TP53* (SORLIE *et al.*, 2001 e 2003).

2.7 DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O único método de detecção precoce que até o momento mostrou reduzir a mortalidade por câncer de mama foi o rastreamento populacional por mamografia em mulheres com idade entre 50 e 69 anos, com um intervalo nunca superior a dois anos. Apesar de ser um método eficaz, a mamografia não exclui o auto-exame e o exame clínico feito pelo ginecologista ou mastologista, já que alguns nódulos, apesar de palpáveis, não são detectados pela mamografia. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional o exame mamográfico, a cada pelo menos dois anos para mulheres de 50 a 69 anos de idade, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos de idade. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para o câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau), recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia anualmente, a partir de 35 anos de idade (INCA, 2008).

Em relação ao Auto Exame das Mamas (AEM), recomenda-se a sua realização por todas as mulheres a partir dos 20 anos de idade (SHAPIRO *et al.*,

1992). A periodicidade deve ser mensal, 4 a 6 dias após o término do fluxo menstrual. Trata-se de um método que deve ser incentivado pela grande abrangência na população e pela ausência de custo. O Exame Clínico das Mamas constitui a base para a solicitação de exames complementares (CONSENSO PARA O CONTROLE DO CÂNCER DE MAMA, 2003). Deve ser realizado a cada três anos entre os 20 e 40 anos, e depois anualmente (SHAPIRO *et al.*, 1992). Sua eficácia depende da qualidade com a qual é realizado. O exame clínico das mamas é acessível a um menor número de mulheres quando comparado ao auto-exame das mamas; pode detectar lesões menores e é mais importante em mulheres mais jovens, faixa na qual a mamografia tem limitações.

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama são a cirurgia e a radioterapia para o tratamento regional, a quimioterapia e a hormonioterapia para o tratamento sistêmico (BARROS *et al.*, 2001; CONSENSO PARA O CONTROLE DO CÂNCER DE MAMA, 2003). O tratamento do câncer de mama deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento integral do paciente.

A análise dos linfonodos axilares é, hoje, o fator prognóstico mais importante para pacientes com câncer de mama. A presença de metástases axilares indica que o tumor é capaz de gerar metástases à distância; portanto, mostra uma característica mais agressiva do mesmo. Alguns estudos mostram uma relação direta de tais fatores com a sobrevida e estratificam as pacientes em quatro grupos, com base em dados do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP): linfonodos negativos, 1 a 3 linfonodos acometidos, 4 a 9, e 10 ou mais linfonodos positivos. A sobrevida em 5 anos é de 83% para pacientes com axila negativa, 73% se há 1 a 3 linfonodos acometidos, 46% para 4 a 12 linfonodos e para mais de 13 linfonodos acometidos (SILVA, ROCHA e BARINI, 2006).

Em pacientes com axila positiva, o tamanho tumoral é o segundo fator prognóstico mais importante, constituindo a variável mais fundamental a ser analisada em pacientes com axila negativa, sendo um importante fator preditivo para recorrência nessas pacientes.

Classicamente, os tumores ductais invasivos têm pior prognóstico e maior incidência de acometimento axilar que os tumores invasivos menos comuns. Existem tipos histológicos especiais de câncer de mama que apresentam melhor prognóstico (menor índice de metástases axilares e maior intervalo livre de doença) e que

representam menos de 6% dos casos de câncer invasivo. Esses tipos são: tubular puro, mucinoso (colóide) puro e adenocístico (SILVA, ROCHA e BARINI, 2006).

A graduação histológica mais utilizada é a de BLOOM e RICHARDSON (1957), que leva em consideração a formação tubular das células, a forma e a coloração do núcleo, além da presença de figuras de mitoses, cada um deles sendo pontuado numa escala de 1 a 3. As notas dos três componentes são somadas e adequadas segundo as categorias:

Grau I – Bem diferenciado (bom prognóstico);

Grau II – Moderadamente diferenciado;

Grau III – Indiferenciado (mau prognóstico).

O estudo do NSABP demonstrou que pacientes com tumores bem diferenciados apresentaram taxas de sobrevividas de 93% em 5 anos, comparados com 79% em pacientes com tumores indiferenciados. Pior sobrevida e taxas elevadas de metástase são observadas em tumores de alto grau histológico, independentemente do tamanho e do envolvimento axilar (PAIK, SHAK e TANG, 2005). A graduação nuclear foi estabelecida pelo sistema de Fisher e considera o tamanho do núcleo, a forma, o componente nucleolar, o padrão de cromatina e a taxa de mitose (FISHER, ANDERSON e REDMOND, 1993).

A quantificação dos receptores hormonais – receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) – é atualmente uma estratégia fundamental para estabelecer o tratamento adequado a mulheres com câncer de mama. Receptores de estrogênio estão presentes em 75% a 80% dos carcinomas da mama, em proporção crescente conforme a idade. Seu valor prognóstico é difícil de ser avaliado, uma vez que tal avaliação deve ser feita na ausência de tamoxifeno adjuvante. É possível que a presença de RE e RP possa apenas ser indicativa de tumores mais indolentes, com menor velocidade de crescimento e longo período para recorrência da doença. A presença de RE e RP também é um forte fator preditivo para a probabilidade de resposta à terapia endócrina com tamoxifeno (PRITCHARD, 2002). Os dados mais recentes do *EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP* (EBCTCG, 2005) mostram que o uso do tamoxifeno por 5 anos em terapia adjuvante para tumores com RE positivo reduz a taxa de mortalidade anual por câncer de mama em 31%, independentemente do esquema de quimioterapia utilizado, da idade, do status do receptor de progesterona ou de outras características tumorais. A determinação do status dos receptores

hormonais é essencial para a seleção de pacientes que podem se beneficiar do uso de terapia hormonal, tornando-se, portanto, um fator preditivo importante para consideração da terapêutica.

Além dos receptores hormonais, o *ERBB2* (*HER2*) também é considerado fator preditivo e prognóstico do câncer de mama. O *HER2* é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17q21 e quando ativado codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade intrínseca de tirosina quinase homóloga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*). Este proto-oncogene está amplificado em cerca de 30% dos tumores de mama. Sua superexpressão está associada à maior agressividade tumoral, a taxas de recorrência mais altas e à maior mortalidade em pacientes com linfonodos positivos. A influência desta superexpressão em pacientes com linfonodos negativos é variável. A interpretação de vários estudos que analisam a expressão do *HER2* é limitada pela variabilidade dos métodos empregados para detectá-la, pela definição de positividade e pela maioria dos estudos serem retrospectivos. Os métodos empregados para detecção da expressão do *HER2* podem ser direcionados para detectar a proteína de membrana ou a própria amplificação gênica. A detecção da proteína de membrana é amplamente utilizada e difundida em vários centros, onde pode ser feita com técnicas de imunohistoquímica. Esta faz uma interpretação qualitativa baseada na intensidade da coloração da membrana e tem uma limitação por ser um método de análise subjetiva, o que resulta em diferenças nas classificações quando são feitas análises inter e intra-observadores. A amplificação gênica em nível nuclear pode ser avaliada pela técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Existe uma alta correlação entre amplificação gênica e superexpressão protéica. A técnica de FISH é mais fidedigna quando se compara com a imunohistoquímica para estabelecer o prognóstico. Nesta, os tumores podem ser classificados em 0 (ausência de coloração da membrana), 1+ (fracamente positivo), 2+ (positividade intermediária) e 3+ (fortemente positivo, com intensa imunocoloração em toda a membrana em mais de 10% das células neoplásicas). Já no método de FISH, classifica-se como positivo ou negativo para amplificação gênica.

O *HER2* é considerado um fator prognóstico e preditivo. É fator prognóstico por estar associado à maior agressividade tumoral. Sua utilização como fator preditivo deve-se ao fato de ele ser o alvo principal da terapia com trastuzumabe. A proteína *HER2*, quando ligada aos fatores de crescimento tumoral, inicia uma

casca de reações que promovem a divisão celular e, por conseqüência, o crescimento do tumor. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal desenvolvido para bloquear essa proteína transmembrana. Portanto, apenas beneficiam-se dessa terapêutica as pacientes com imunohistoquímica positiva 3+ ou FISH positivo. As pacientes que possuem imunohistoquímica 2+ devem ser submetidas a teste com a técnica FISH, uma vez que podem se beneficiar se forem positivas. O uso deste medicamento foi inicialmente descrito em pacientes com doença metastática, nas quais se mostrou efetivo para indução de remissão parcial ou completa da doença e aumento da sobrevida global. Atualmente, estudos validaram o uso dessa droga também como adjuvante. A seleção de pacientes que receberão trastuzumabe como terapia adjuvante é baseada na análise de um conjunto de fatores prognósticos individuais de cada paciente (SILVA, ROCHA e BARINI, 2006).

Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Isso ocorre provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2006). Segundo OLDENBURG *et al.* (2007), as anormalidades da mama devem ser avaliadas por um triplo acesso, incluindo o exame clínico, exame por imagem (mamografia e ultra-som) e retirada de amostra do tecido por citologia aspirativa ou biópsia por agulha.

2.8 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com fatores genéticos, ambientais e reprodutivos interagindo de uma maneira complexa (KUBBA, 2003).

Um trabalho recente, de OLDENBURG *et al.* (2007), indicou alguns dos principais fatores de risco para o câncer de mama. A **idade** aparece como um dos principais fatores de risco para os cânceres em geral, visto que estes ocorrem pelo acúmulo de mutações em determinadas células ou tecidos. Mais de 80% dos casos de câncer de mama acometem mulheres com idade igual ou superior a 50 anos, e somente 5% dos casos ocorrem em mulheres com menos de 30 anos. Segundo HULKA e MOORMAN (2001), a incidência do câncer de mama está abaixo de 10 casos a cada 100 mil mulheres com 25 anos ou menos de idade, e aumenta mais de

10 vezes aos 40 anos. O aumento da incidência logo após a menopausa (40 a 50 anos) tende a diminuir após este período, provavelmente devido à diminuição nos níveis de estrogênio circulante (HENDERSON *et al.*, 1991). Estes dados mostram a importância do rastreamento para o câncer de mama em mulheres com mais de 40 anos. Outro aspecto indicado por OLDENBURG e colaboradores é, obviamente, a ocorrência quase que exclusiva da doença no sexo feminino, já que somente um a cada 150 casos de câncer de mama ocorre em indivíduos do sexo masculino (HILL *et al.*, 2005). A **etnicidade** também pode ser vista como um fator de risco, já que algumas populações apresentam taxas de incidência muito maiores do que outras. Nos Estados Unidos a taxa de incidência do câncer de mama é 20 a 40% maior em mulheres brancas do que em mulheres negras americanas. A idade e as especificidades étnicas se tornam ainda mais relevantes após a menopausa. Nos Estados Unidos e Suíça o risco específico por idade continua a subir até os 75 anos, enquanto que no Japão este risco é levemente menor após os 45 anos (HULKA e MOORMAN, 2001).

O tempo de exposição aos **hormônios sexuais** foi corroborado como um fator de risco importante por muitos estudos epidemiológicos, incluindo os hormônios sexuais endógenos relacionados ao ciclo menstrual, e hormônios exógenos, provenientes do uso de contraceptivos, realização de terapia de reposição hormonal e da dieta (DUMITRESCU e COTARLA, 2005). O hormônio ou combinação de hormônios responsáveis pelo início do câncer de mama ainda não foram identificados com clareza, entretanto acredita-se que o **estrogênio** seja um dos principais fatores moduladores do risco de desenvolver a doença (OLDENBURG *et al.*, 2007). O desenvolvimento da mama na puberdade e durante a maturidade sexual é estimulado pelo estrogênio 17 β -estradiol (E2), que é o esteróide predominante na circulação e o mais importante para o tecido mamário (RUSSO e RUSSO, 2006). O estrogênio estimula a divisão celular no tecido mamário, o que pode aumentar o risco de ocorrência de danos permanentes ao DNA, principalmente em mulheres jovens, quando as células da mama ainda não estão totalmente maduras, não possuindo mecanismos eficientes de reparo do DNA, que se liga mais freqüentemente a carcinógenos (CHABNER e MURPHY, 2005). Acredita-se também que o estrogênio possua um efeito anti-apoptótico nas células expostas a esse hormônio, o que impede a morte das células que sofreram danos no DNA, e conseqüentemente em genes que controlam o ciclo celular (NAROD e FOULKES,

2004). Além disso, os estrogênios catecóis podem agir como carcinógenos (LIEHR, 2000), se ligando ao DNA ou produzindo espécies de oxigênio reativas ao serem metabolizados. Sendo assim, uma exposição prolongada ao estrogênio parece aumentar o risco para o câncer de mama.

Menarca precoce, antes dos 12 anos, aumenta o risco em 10 a 20%, e menopausa tardia confere um risco de aproximadamente 3% para cada ano de aumento na idade da menopausa (*COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTOR IN BREAST CANCER, 1996*). Ao contrário, menarca tardia e menopausa precoce, antes dos 40 anos, resultam em significativa redução do risco (RUSSO e RUSSO, 2006).

O uso de **contraceptivos orais** ou **terapia de reposição hormonal** (especialmente progesterona e estrogênio combinados) também aumentam ligeiramente o risco de câncer de mama, mas não chegam a afetar as taxas de incidência da doença. Os resultados do *COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER* (1996), que compilaram dados de 54 estudos epidemiológicos sobre o assunto, mostram que não há um aumento no risco em mulheres com mais de 45 anos, não há sinergia com história familiar de câncer de mama, há um efeito protetor contra doenças benignas da mama e não há um efeito do tempo de uso, tipo de pílula e idade do primeiro uso. A questão do efeito latente do contraceptivo hormonal no câncer de mama, ou seja, se uma mulher que usou pílula quando era jovem continuará a ter um risco aumentado de câncer de mama na perimenopausa e pós-menopausa, foi contestada por estudos epidemiológicos bem conduzidos e com amostras grandes, sendo que nenhum mostrou latência (*COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 1996; MARCHBANKS et al., 2002*). Entretanto, segundo BRAY *et al.* (2004), o risco conferido pelo uso de contraceptivos orais é menor que o decorrente de terapia de reposição hormonal, embora ele persista por até 10 anos após o término do uso.

A **obesidade na pós-menopausa** é um fator de risco devido ao aumento nos níveis endógenos de estrogênio em mulheres obesas (o tecido adiposo é uma fonte importante de estrogênio), sendo que para cada 5 kg de ganho de peso há um aumento de 8% no risco relativo (TRENTHAM *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2003; McTIERNAN *et al.*, 2003; LAHMANN *et al.*, 2004). Estudos com mulheres na pós-menopausa mostraram uma correlação positiva entre **aumento da densidade**

óssea e risco maior de desenvolver câncer de mama, variando entre 2 e 3,5 vezes (BIGLIA *et al.*, 2004). Isso é explicado pelo fato do hormônio estrogênio ajudar a manter a massa óssea. O consumo excessivo de **álcool** também tem um papel importante. Uma pesquisa de HAMAJIMA *et al.* (2002) compilou dados de 53 estudos, indicando que cerca de 4% dos casos de câncer de mama nos países desenvolvidos são atribuídos ao excesso de álcool.

Outros fatores de risco relevantes citados por OLDENBURG *et al.* (2007) foram a **densidade mamária**, ocorrência de **doenças benignas da mama** e **exposição à radiação**. Mulheres que apresentam mais de 75% de aumento da densidade da mama na mamografia têm um risco aproximadamente cinco vezes maior de desenvolver câncer de mama em relação a mulheres cujo aumento na densidade mamária for menor que 5% (BYRNE *et al.*, 2001; BOYD *et al.*, 2002). Estudos com gêmeos mostraram que a variação populacional da densidade mamária em certa idade apresenta alta herdabilidade, portanto fatores genéticos podem explicar esta variação (VAN GILS *et al.*, 2000; BOYD *et al.*, 2002; STONE *et al.*, 2006). Algumas doenças benignas da mama são consideradas lesões precursoras de câncer de mama invasivo na mesma área. Mulheres com cistos palpáveis, fibroadenomas complexos, papilomas ductais e hiperplasia epitelial têm um leve aumento no risco (1,5 a 3 vezes) em relação a mulheres sem estas alterações (McPHERSON *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a exposição a altas doses de radiação ionizante aumenta o risco, principalmente para mulheres na puberdade (TOKUNAGA *et al.*, 1987). Um exemplo foram os dados obtidos de mulheres vítimas das explosões atômicas de Hiroshima e Nagasaki, indicando um risco aumentado para este e outros tipos de câncer.

Alguns fatores, entretanto, conferem proteção ao câncer de mama. A **gravidez**, por exemplo, possui um efeito protetor bem estabelecido (OLDENBURG *et al.*, 2007). O maior número de filhos e idade precoce da primeira gravidez podem ser alguns dos fatores que explicam a menor incidência do câncer de mama nos países em desenvolvimento em relação aos países desenvolvidos (BRAY *et al.*, 2004). A **amamentação** por um longo período também foi identificada recentemente como tendo um efeito protetor (BERAL, 2003). A **indução da menopausa** por ooforectomia e histerectomia antes dos 35 anos reduz o risco do câncer de mama em 60% em relação às mulheres que entram naturalmente na menopausa (McPHERSON *et al.*, 2000). A prática de **atividades físicas** em adolescentes e

mulheres jovens diminui o risco em 20%; sendo que este efeito é resultado do atraso na menarca e modificação dos níveis hormonais decorrentes do exercício (HANKINSON *et al.*, 2004; LAGERROS *et al.*, 2004). O uso de **fitoestrogênios** na dieta, como isoflavonas e ligninas, é controverso, não existindo, até o momento, evidências suficientes de que estes compostos atuem como protetores do câncer de mama (GIKAS e MOKBEL, 2005).

2.9 ASPECTOS GENÉTICOS EM CÂNCERES DE MAMA

2.9.1 Câncer de Mama Hereditário

A história familiar de câncer de mama é um fator de risco bem estabelecido, sendo que parentes em primeiro grau têm um risco aproximadamente duas vezes maior (*COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER - FAMILIAL BREAST CANCER, 2001*). O risco aumenta conforme o número de parentes consangüíneos afetados, a idade de acometimento, presença de bilateralidade ou história de doença benigna da mama (McPHERSON *et al.*, 2000; THOMPSON e EASTON, 2004). Mesmo em consangüíneos de terceiro a quinto graus observa-se um aumento no risco da doença (AMUNDADOTTIR *et al.*, 2004). Estima-se que 5 a 10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários e atribuídos a mutações em genes de predisposição de alta penetrância, como o *BRCA1* e *BRCA2*. O gene *BRCA1* está localizado em 17q21-q24, e o *BRCA2* em 13q12-q13. Embora estes dois genes não apresentem homologia, eles têm algumas características em comum. Ambos são extensos: o *BRCA1* apresenta 22 exons e codifica uma proteína com 1863 aminoácidos, e o *BRCA2* tem 27 exons e codifica uma proteína com 3418 aminoácidos. Os dois genes são expressos ubiquamente em humanos, principalmente na mama, testículos, ovários e timo (OLDENBURG *et al.*, 2007).

Mutações no *BRCA1* são associadas com o câncer familiar de mama e ovário, enquanto mutações no *BRCA2* são associadas fortemente com o câncer de mama masculino. As estimativas iniciais sugeriam que os genes *BRCA1* e 2 seriam responsáveis por 75% dos casos de câncer de mama em famílias com múltiplos

casos, entretanto dados recentes mostram que estas estimativas deviam estar superestimadas. Mutações foram encontradas em alta porcentagem (45%) em famílias com tumores de mama e ovário, enquanto que a taxa de mutações nestes genes em famílias com casos apenas de câncer de mama foram menores, variando de 15% a 35% (HONRADO *et al.*, 2005). Estas mutações apresentam penetrância incompleta, e dependem de fatores como o tipo da mutação, a população e/ou fatores exógenos. As mutações de sentido trocado 300 T>G no gene *BRCA1* e 4486 G>T no *BRCA2* foram individualmente associadas com um alto risco de câncer de mama, enquanto mutações na região central do *BRCA1* são associadas com um baixo risco (SCOTT *et al.*, 2003). Cerca de 80% dos tumores com alterações nestes genes apresentam mutações sem sentido e geram proteínas truncadas. Os tipos de mutação diferem quanto a etnicidade e localização geográfica, sendo que algumas aparecem muito freqüentemente em certas populações, e são explicadas pelo efeito do fundador. A incidência de indivíduos heterozigotos para mutações no *BRCA1* é cerca de um a cada 1000 indivíduos na população caucasóide em geral, e para o *BRCA2* de cerca de um a cada 750 indivíduos (ANTONIOU *et al.*, 2002). Por exemplo, a prevalência da mutação de predisposição ao câncer no gene *BRCA2*, 999 del5 na população da Islândia, que afeta 7,7% das mulheres e 40% dos homens com câncer de mama (THORLACIUS *et al.*, 1997). O estilo de vida também pode influenciar no risco de desenvolver a doença para portadores de mutações *BRCA1/2*, por exemplo, a prática de exercícios físicos e ausência de obesidade em adolescentes são fatores de proteção (CAVALIERI *et al.*, 2000).

Os supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* são considerados “*caretakers*” (OLDENBURG *et al.*, 2007), desde que suas funções estão ligadas a processos metabólicos chaves para o organismo, como reparo de danos no DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular (VENKITARAMAN, 2002; CIPOLLINI *et al.*, 2004). Durante a última década, muitas das funções celulares e bioquímicas das proteínas dos genes *BRCA1/2* foram descobertas. O *BRCA1* atua no reparo do DNA, ubiquitinação de proteínas, remodelamento da cromatina e controle dos pontos de checagem do ciclo celular. O *BRCA2* está envolvido no reparo de quebras no DNA fita dupla, através da recombinação homóloga, mas pouco se sabe ainda sobre suas funções (OLDENBURG *et al.*, 2007).

O câncer de mama em portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* difere morfológicamente dos casos esporádicos em indivíduos pareados por idade.

Um exemplo é a maior ocorrência do Carcinoma Ductal Invasivo nestes indivíduos (CHAPPUIS *et al.*, 2000). Uma das características mais importantes dos tumores com alterações no *BRCA1* é o seu alto grau histológico, sendo que a proporção de tumores de grau III varia entre 66 a 84% (LYNCH *et al.*, 1998; PALACIOS *et al.*, 2003; EEROLA *et al.*, 2005). Tumores com mutações no *BRCA2* também apresentam um alto grau histológico em relação a tumores esporádicos, embora esta associação seja menor do que no caso dos indivíduos com *BRCA1* mutado. Tumores com *BRCA1* mutado apresentam uma alta frequência de negatividade para os receptores de estrogênio, de 73 a 90% dos casos, e progesterona, 79% dos casos (HONRADO *et al.*, 2005). Ao contrário, os tumores com *BRCA2* mutado não diferem dos tumores esporádicos quanto à expressão dos receptores de estrogênio e progesterona. Muitos estudos não demonstraram diferenças quanto ao tipo histológico em tumores esporádicos e com mutações no *BRCA2* (LAKHANI *et al.*, 1997; LAKHANI *et al.*, 1998; AGNARSSON *et al.*, 1998).

Outros genes que conferem alta predisposição ao câncer de mama são os genes *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), *TP53*, *KLKB1* (*kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1*), *STK11* (*serine/threonine kinase 11*) e *CDH1* (*cadherin 1, type 1, E-cadherin, epithelial*). Alterações nestes genes conferem um risco de desenvolver câncer de mama superior a quatro vezes o risco da população em geral, mas menor que o risco conferido por mutações no *BRCA1* ou *BRCA2*. O gene supressor de tumor *PTEN* está envolvido na Síndrome de Cowden, e foi encontrado mutado em casos de câncer de mama esporádico. Mulheres com mutações neste gene têm um risco duas a quatro vezes maior de desenvolver câncer de mama. O gene *TP53* codifica uma proteína (TP53) envolvida no controle do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA. Sua expressão é ativada em resposta a sinais de stress, como danos no DNA. A perda de função deste gene suprime um mecanismo de proteção contra o acúmulo de alterações genéticas (PLUQUET e HAINAUT, 2001). Mutações germinativas no *TP53* caracterizam a Síndrome de Li-Fraumeni e são raras, menos de 400 famílias com mutações neste gene foram descritas no mundo inteiro. Esta síndrome ocorre em crianças e adultos jovens, com a presença de tumores primários múltiplos, como câncer de mama (MALKIN *et al.*, 1990). O gene *KLKB1/STK11* age como um supressor de tumor e codifica uma serina/treonina quinase. Mutações germinativas neste gene causam a Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ). Um elevado risco para doenças malignas gastrointestinais, da mama, pâncreas, ovário, útero,

pulmão e testículos é reconhecido em pacientes com esta síndrome. O risco de desenvolver câncer de mama em pacientes com SPJ aos 65 anos varia entre 29 e 54%. O gene da caderina-E, *CDH1* sintetiza uma proteína com papel fundamental na manutenção da diferenciação e arquitetura normal dos tecidos epiteliais. Mutações germinativas truncadas no *CDH1* estão associadas com a ocorrência da Síndrome do Câncer Gástrico Difuso (HDGC). Em famílias com esta síndrome o risco de desenvolver câncer de mama é estimado entre 20 e 40%. Mutações somáticas no *CDH1* são freqüentemente encontradas no câncer de mama lobular invasor e *in situ* (OLDENBURG *et al.*, 2007).

2.9.2 Perda de Heterozigose (LOH)

Para que ocorra a perda de função de genes supressores de tumor há a necessidade da inativação dos dois alelos. Conforme o modelo de Knudson para o gene do retinoblastoma (*RB1*) (KNUDSON, 1971), o primeiro alelo geralmente é inativado por uma mutação gênica (somática ou germinativa), e o segundo por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene está localizado. Marcadores do DNA que antes da progressão tumoral se encontravam em heterozigose podem sofrer uma redução, alcançando a perda alélica total. Este mecanismo é conhecido como perda de heterozigose (LOH) (WEINBERG, 1991). Quando a LOH é observada como um evento somático específico para o tumor, é um indicativo de deleção de um dos alelos de um gene supressor de tumor. Portanto, a pesquisa de LOH pode indicar novos genes supressores tumorais na região homóloga correspondente (KEMP *et al.*, 2002). Geralmente, utilizam-se marcadores microssatélites neste tipo de estudo, pois estes são altamente polimórficos, exibem alta taxa de heterozigose e estão amplamente distribuídos pelo genoma (PERUCHO, 1996).

Também conhecidos como “repetições curtas em sequência” ou “STRs” (do inglês *short tandem repeats*), os marcadores microssatélites são um tipo de DNA repetitivo com seqüências de 2 a 6 nucleotídeos de repetição (YEE *et al.*, 1994). O número de unidades de repetição para um determinado loco pode variar, resultando em alelos com tamanhos diferentes. (MANUAL APPLIED BIOSYSTEMS, 2004). Os microssatélites possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de

mutação nestes locos, que variam de 10^{-2} a 10^{-6} por geração. Existem alguns modelos que explicam essas altas taxas de mutação, como o *crossing-over* desigual, o *slippage* durante a replicação, substituições de nucleotídeos, eventos de duplicação e os elementos transponíveis *Alu* (SCHLÖTTERER, 2000). Entretanto, é aceito que o evento mutacional mais comum nas seqüências microssatélites é o *slippage*, ou “deslizamento” das fitas de DNA em locais em que as mesmas são compostas por seqüências repetitivas, um processo que envolve o ganho ou perda de uma ou mais unidades de repetição (LEVINSON e GUTMAN, 1987; SCHLOTTERER e TAUTZ, 1992).

Muitos fatores influenciam na ocorrência de mutações em seqüências microssatélites, como o tamanho do alelo e o conteúdo de G/C (CHAKRABORTY *et al.*, 1997; ELLEGREN, 2000; ELLEGREN, 2002). Os padrões de mutação também vão depender do contexto genômico, como a localização no cromossomo (CHAKRABORTY *et al.*, 1997).

A variação alélica, o número de repetições e as frequências dos alelos estão disponíveis na literatura para centenas de marcadores microssatélites em vários organismos. A possibilidade de escolher marcadores altamente informativos e bem caracterizados fez com que a análise de microssatélites se tornasse bem aceita em estudos de associação, de ligação e de identificação de organismos (MANUAL APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Há três métodos mais comumente usados para a detecção de microssatélites: PCR radioativa visualizada por autoradiografia, PCR visualizada em géis de poliacrilamida corados com prata e PCR com iniciadores fluorescentes visualizada em seqüenciador automático de DNA. A última metodologia é a mais utilizada atualmente e é a mais precisa, além de permitir que um grande número de marcadores possa ser estudado ao mesmo tempo em várias amostras. Outra vantagem deste método é a sensibilidade de detecção quando há uma quantidade limitada de DNA para análise e quando há contaminação com outros tipos celulares (EDWARDS e BARTLETT, 2003).

A detecção de LOH é especialmente problemática se as células tumorais não forem separadas das células normais adjacentes com precisão, utilizando um aparelho de microdissecção. O uso da técnica de PCR com iniciadores fluorescentes e visualização dos genótipos em seqüenciador automático de DNA permite o cálculo da altura e área dos picos dos alelos normais e tumorais. Desta maneira, podem ser

utilizados limites de redução de um dos alelos com base nos dados de altura ou área dos picos. Se for feita microdissecção, a LOH é fortemente indicada por taxas menores que 0,5 ou maiores que 2,0. Desta maneira, a análise de LOH deve ser feita preferencialmente através de métodos que permitam a identificação dos alelos em pares de bases e a determinação de suas áreas e alturas (DIETMAIER *et al.*, 1999).

TOMLINSON *et al.* (2002) afirmam que o principal problema metodológico associado à análise de LOH é que amostras tumorais frescas geralmente apresentam contaminação com células normais, além de haver heterogeneidade genética no tumor. Na prática, a perda completa de um alelo é raramente observada em estudos de LOH devido à contaminação com tecido normal, sendo necessário equacionar a perda alélica no tumor com a desproporção entre os dois alelos no sangue e tumor. Então a LOH passa a ser definida como uma redução significativa na dosagem de um dos alelos no tumor. Muitos estudos usam um limite de 50% de redução (ZAUBER *et al.*, 1999) como sendo “significante”, embora outros usem limites menos estridentes. Alguns trabalhos utilizam a área dos picos, outros a altura (TOMLINSON *et al.*, 2002).

As primeiras descrições de LOH em neoplasias foram em 1987 por ALI *et al.* e LUNDBERG *et al.* (apud MAO *et al.*, 2005). Apesar das centenas de estudos subseqüentes sobre a perda de heterozigose em câncer de mama esporádico, o número e identidade de todos os genes supressores de tumor relevantes à doença permanecem desconhecidos (DEVILEE *et al.*, 2001). Em pesquisas realizadas por BECKMANN *et al.* (1997) e INGVARSSON *et al.* (1999) com tumores de mama, foram identificadas LOH nos cromossomos 1, 3p, 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11, 13q, 16q, 17, 18q, 22q e X. Entretanto, suas relações com genes conhecidos e com diferentes estágios da doença ainda não haviam sido elucidadas. Em uma meta-análise de MILLER *et al.* (2003) com 151 estudos sobre LOH em câncer de mama (correspondendo a mais de 15 mil tumores), foram observadas perdas preferenciais em regiões específicas dos cromossomos 7q, 16q, 13q, 17p, 8p, 21q, 3p, 18q, 2q e 19p (em ordem decrescente de significância). OLDENBURG *et al.* (2006), trabalhando com 100 tumores de mama familiares não relacionados aos genes *BRCA1/2*, verificaram perdas de heterozigose 40% mais freqüentes nas regiões 1q41, 4p16, 11q23.3, 16p13, 16q24, 17p12, 21q22, 22q11 e 22q13, sendo esta

última região a mais freqüente. Exceto para a região 22q, a LOH em muitos destes sítios cromossômicos já haviam sido descritas para tumores de mama esporádicos.

O braço curto do cromossomo 9 contém vários genes supressores de tumor descritos, e possivelmente outros ainda desconhecidos. Segundo EIRIKSDOTTIR *et al.* (1995) e BRENNER e ALDAZ (1995), 38 a 58% dos tumores de mama apresentam deleções no braço curto do cromossomo 9. Em seu trabalho, EIRIKSDOTTIR *et al.* (1995) correlacionaram a presença de LOH em 9p21-p23 com fatores clínicos e patológicos. Tumores com LOH em 9p foram associados a alta taxa de atividade na fase S do ciclo celular e aneuploidias, mas não com o tipo de tumor, status dos linfonodos, presença de receptores de estrogênio e progesterona e idade das pacientes. A presença de LOH em 9p foi fortemente associada com LOH nas regiões cromossômicas 3p e 6q, contribuindo para um melhor entendimento dos eventos genéticos na patogênese dos tumores de mama. No trabalho de MAO *et al.* (2005) com pacientes chinesas com câncer de mama, as perdas alélicas mais freqüentes foram identificadas nos marcadores D3S1578 (56%); D7S507 (55%); D1S2766 (50%); D17S789 e D17S946 (43% cada); D19S814 (35%); D2S162, D13S158 e D13S296 (33% cada); D1S551 e D1S2800 (29% cada); D3S1597 e D6S260 (22% cada); e D1S1588 (21%). A frequência de LOH no marcador da região 9p22.2-21.1 utilizado, D9S274, não foi significativa na amostra estudada. Estes resultados demonstram alta frequência de LOH nos cromossomos 1 e 2p nas pacientes chinesas. GORGOULIS *et al.* (2005) realizaram uma análise sistemática em lesões pré-cancerosas e cancerosas de pulmão a fim de determinar quando, durante o desenvolvimento do câncer, ocorre a parada no ponto de checagem do ciclo celular comandada pelo gene *TP53* (“DNA double strand breaks” ou DNA DSB). Usando marcadores microssatélites, observaram que o sítio mais comum de perdas alélicas em hiperplasias e carcinomas foi 3p14. A região 9p (representada pelos marcadores microssatélites D9S157 e D9S162) não apresentou variação quanto à frequência de perdas entre o tecido normal, hiperplásico ou canceroso. No trabalho de RUSSO e RUSSO (2006), foi utilizada a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) com uma linhagem de células epiteliais da mama (MCF-10F) que sofreram transformação neoplásica com o hormônio 17 β -estradiol (E2), e foram detectadas perdas em 9p11-p13. Este loco contém outro gene supressor de tumor, *PRSS3* (*protease, serine, 33*), cujo não balanceamento alélico

já havia sido reportado em carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais (VERDORFER *et al.*, 1999), e carcinoma *in situ* da bexiga (HOPMAN *et al.*, 2002).

ELLSWORTH e colaboradores realizaram uma série de trabalhos associando instabilidade genômica e perda de heterozigose no câncer de mama. Inicialmente, propuseram um painel com 52 marcadores microssatélites de 26 regiões comumente deletadas nos cânceres mamários, que poderia ser usado para detectar rapidamente padrões de LOH em um grande número de amostras de tumores, proporcionando a delimitação das regiões mínimas de deleção, indicativas do mapeamento de prováveis genes supressores de tumor ainda não identificados. Os marcadores para 9p utilizados foram D9S171 (em 9p21.3), que apresentou 80% de heterozigose, e D9S304 (em 9p21.1), que apresentou 85% de heterozigose (ELLSWORTH *et al.*, 2003). Posteriormente (ELLSWORTH *et al.*, 2005), utilizaram este painel de marcadores microssatélites para comparar alterações cromossômicas em amostras de tumores primários de mama e metástases nos linfonodos axilares, a fim de identificar alterações únicas para tumores primários ou metastáticos. A frequência de perdas alélicas foi significativamente maior nos tumores primários, sendo que as alterações em 11q23.3 e 17p13.3 foram as mais freqüentes. A frequência de LOH para os marcadores em 9p utilizados no painel foi de 13% nos tumores primários e 8% nos tumores metastáticos dos linfonodos axilares. As LOH observadas foram estratificadas em tumores de mama somente, tumores metastáticos nos linfonodos somente ou nos dois tipos de tumores (congruência). LOH somente nos tumores de mama foram as mais freqüentes, correspondendo a mais de 60% dos casos. A ocorrência de LOH em 9p acompanhou o padrão geral (60% nos tumores primários e 40% nos metastáticos). Em um trabalho mais atual (ELLSWORTH *et al.*, 2007), correlacionaram o nível de instabilidade genômica em diferentes graus histológicos de CDIS. A frequência média de instabilidade genômica não diferiu significativamente entre tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados (graus I e II, respectivamente). Entretanto, a instabilidade genômica ocorreu mais significativamente em lesões de grau III, e nos cromossomos 6q25-q27, 8q24, 9p21, 13q14 e 17p13.1. As perdas alélicas em 9p21 e 13q14 foram detectadas em mais de 50% dos CDIS de alto grau, e não foram detectadas em lesões de baixo grau. Nestas duas regiões há potenciais genes candidatos envolvidos com a proliferação celular e controle do ciclo celular, como o *RB1* no cromossomo 13, e *CDKN2A* no cromossomo 9. Em outra pesquisa (ELLSWORTH *et*

al., 2008) trabalharam com tumores de mama primários invasivos de diferentes graus. Os níveis médios de perdas foram maiores nos tumores de grau III em relação aos de grau I. Os tumores de grau I foram associados com deleções grandes em 16q22, enquanto alterações em 9p21, 11q23, 13q14, 17p13.1 e 17q2 foram características de tumores de grau III. Em geral, os níveis de LOH em carcinomas de grau II foram intermediários aos de graus I e III. Neste trabalho, alterações em 9p21 ocorreram em 2% dos tumores de grau I, 23% dos tumores de grau II e 21% dos tumores de grau III analisados. A alta frequência de alterações em 9p21, 11q23 e 17p13.1 sugerem que estas regiões contém genes que fazem parte da via genética de discriminação entre tumores de baixo e médio graus. Como as alterações em 9p21 ocorrem freqüentemente em tumores de graus II e III, estas são consideradas um evento inicial no desenvolvimento de tumores de alto grau.

2.9.3 LOH no gene *CDKN2A*

A primeira descrição do gene *CDKN2A* foi feita por SERRANO *et al.* em 1993, e o mapeamento em 9p21.3 por KAMB *et al.* em 1994. Outro gene localizado em 9p21 é o *CDKN2B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*). Estes genes codificam dois membros da família de inibidores de quinase dependentes de ciclina, *CDKN2A* (conhecida como p16) e *CDKN2B* (conhecida como p15), respectivamente. Os inibidores de quinase dependentes de ciclina previnem a fosforilação da proteína RB pela inibição dos complexos CDK4/6-ciclina D, e assim a RB permanece ligada ao fator de transcrição E2F, não ocorrendo a transição G1/S (e promovendo um prolongamento do ciclo celular para que ocorra o reparo do DNA) (SHERR, 2000; 2001). Deleções homozigotas no gene *CDKN2* foram encontradas em uma grande variedade de linhagens celulares de câncer e em tumores primários (KAMB *et al.*, 1994; NOBORI *et al.*, 1994), e a proteína *CDKN2A* é um regulador negativo importante da progressão do ciclo celular, classificando este gene como um supressor de tumor. SHERR (1996) sugeriu que a importância do envolvimento da proteína *CDKN2A* em cânceres humanos é secundária apenas à do gene *TP53*, que codifica a proteína TP53 (ativada em casos de lesões no DNA, que permite que a proteína *CDKN2A* iniba os complexos ciclina/CDK). Entretanto, a análise da região do gene *CDKN2A* mostrou frequências de mutações muito variáveis entre diferentes

tipos de tumor e linhagens celulares de câncer (CAIRNS *et al.*, 1994; SPRUCK *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1994; MUSGROVE *et al.*, 1995; RUSH *et al.*, 1995; CALVANO *et al.*, 1997). Estes resultados mostram que outros genes na região 9p possam ser alvos de inativação em pelos menos alguns tipos de tumores (OTSUKI *et al.*, 1995; HABER, 1997).

A fim de estabelecer se uma mutação de sentido trocado no *CDKN2A*, comum em melanoma familiar na Polônia (148 A>T), predispõe ou não ao câncer de mama, DEBNIK *et al.* (2007) realizaram um estudo com 4.209 casos de câncer de mama familiar e 3.000 controles (pessoas sem história de câncer), pareados por etnia em uma população da Polônia. No estudo de associação, o valor de *Odds ratio* para mulheres com câncer de mama com menos de 50 anos foi significativo; de 1,5 ($p=0,002$), e para mulheres com mais de 50 anos foi 1,3 ($p=0,2$), portanto não significativo. O efeito de associação foi particularmente forte em mulheres diagnosticadas antes dos 30 anos de idade (*Odds Ratio*=3,8; $p=0,0002$). Portanto, esta variante do *CDKN2A* foi considerada de suscetibilidade para o câncer de mama na Polônia. Os autores sugerem que esta associação seja confirmada em outras populações.

Mutações somáticas no *CDKN2A* não foram bem estudadas no câncer de mama até o momento, mas o silenciamento deste gene por metilação aparece como um evento comum na inativação deste supressor de tumor no tecido mamário (NIELSEN *et al.*, 2001). A deleção ou a perda de heterozigose no loco do *CDKN2A* são relativamente comuns no câncer de mama (GORGOULIS *et al.*, 1998). Um estudo recente, de SHARMA *et al.* (2007), analisou o papel de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, no desenvolvimento do câncer de mama. Eles estudaram a metilação em múltiplos genes relacionados ao câncer, *CDKN2A*, *ARF* (*ADP-ribosylation factor*), *CCND2* (*cyclin D2*) e *SLIT2* (*slit homolog 2*) em carcinoma ductal invasor, e verificaram que 86% dos tumores e 83% dos controles apresentaram metilação em pelo menos um destes quatro genes. A frequência de metilação no *CDKN2A* foi de 44%. O autor propõe que o padrão de expressão do *CDKN2A* pode estar relacionado a eventos epigenéticos, sugerindo esta via como um alvo potencial para estratégias terapêuticas baseadas na reversão do silenciamento epigenético destes genes.

Alguns pesquisadores analisaram o padrão de metilação do *CDKN2A* em outros tipos de câncer. KEKEEVA *et al.* (2007) encontraram metilação anormal deste

gene em amostras de câncer de próstata. Altos níveis de metilação foram encontrados nos tumores epiteliais e nos tumores de células estromais da próstata, e níveis menores de metilação nas amostras de hiperplasia ou de tecido normal. Eles sugerem que a metilação em células não-neoplásicas de um tumor de próstata tenham um papel importante no desenvolvimento e progressão deste tipo de câncer. Já SOUFIR *et al.* (2007), analisando a metilação em promotores alternativos do *CDKN2A* em carcinomas genitais epiteliais e seus precursores, não associaram a metilação como um mecanismo freqüente de inativação do *CDKN2A* neste tipo de carcinoma. BUCHYNSKA *et al.* (2007) verificaram a expressão do *CDKN2A* e outros genes em carcinomas de ovário de diferentes graus. Observaram ausência da expressão deste gene no tecido epitelial normal dos ovários, e uma alta expressão nos carcinomas de ovário. A associação com os graus histológicos demonstrou que os níveis máximos de expressão ocorrem nos carcinomas de ovário de grau III. Portanto, a super expressão do *CDKN2A* é um fator de prognóstico ruim para o câncer de ovário, demonstrando que não há metilação no tecido canceroso.

Vários estudos com câncer de mama analisaram a LOH em 9p, principalmente na região que compreende o gene *CDKN2A*. No trabalho de BRENNER e ALDAZ (1995), a frequência de LOH 9p21-p22 foi de 58%. AN *et al.* (1999) observaram freqüências de LOH nesta região de 42,65%. Neste trabalho foram analisadas alterações na porção distal de 9p em cânceres de mama esporádicos, com 22 marcadores microssatélites entre 9p22-p24 em 80 tumores. Este estudo revelou deleções em duas regiões comuns de sobreposição, D9S281 a D9S286 e D9S1808 a D9S298. No trabalho de KITTINIYOM *et al.* (2001) a LOH em 18p foi correlacionada com LOH em outras regiões conhecidas por sofrer deleções alélicas no câncer, sendo as alterações mais comuns nos cromossomos 3p, 17p, 17q e 9p (região D9S171-D9S1748). Estes resultados sugerem um grupo de locos críticos para o desenvolvimento do câncer de mama, incluindo as regiões dos genes supressores tumorais *CDKN2A* e *TP53* (17p).

MARIATOS *et al.* (2000), trabalhando com carcinomas de pulmão de células não-pequenas, observaram uma expressão alterada da proteína *CDKN2A* em 41,4% dos tumores. Freqüências altas de perdas alélicas foram identificadas nas regiões dos marcadores D9S161 e D9S157, em 9p. A expressão anormal de *CDKN2A* foi correlacionada com perdas alélicas em D9S161 ($p=0,004$). As perdas em D9S157 ocorreram mais freqüentemente nos estágios iniciais dos tumores ($p=0,018$), e foram

associadas com deleções em D9S161 ($p=0,035$). Os autores concluíram que a expressão anormal da *CDKN2A* contribui para o crescimento deste tipo de tumor, principalmente por aumentar a atividade proliferativa nos estágios iniciais do processo carcinogênico. A associação com aneuploidias simplesmente são um reflexo do impacto da ação descontrolada da *CDKN2A* na capacidade de proliferação celular. Eles sugerem outros possíveis genes supressores de tumor nesta região envolvidos com o desenvolvimento dos carcinomas de pulmão de células não-pequenas.

Alterações no *CDKN2A* decorrentes de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 9 também foram descritas para vários outros tipos de tumor, como em carcinomas de glândula salivar (CERILLI *et al.*, 1999), melanoma (FOUNTAIN *et al.*, 1992), carcinoma hepatocelular (PIAO *et al.*, 1998; GANG *et al.*, 2000; SHAO *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001), câncer de pulmão (MERLO *et al.*, 1994), câncer de cabeça e pescoço (VAN DER RIET *et al.*, 1994; WABER *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 2003), carcinoma renal (PRESTI *et al.*, 2002), entre outros.

3. JUSTIFICATIVA

Os tumores de mama apresentam uma alta incidência, representando o segundo tipo de câncer mais freqüente no Brasil e no Mundo, e o primeiro entre as mulheres. Entretanto, são tumores de bom prognóstico se diagnosticados e tratados precocemente, sendo que a taxa de sobrevida na população mundial após 5 anos é, em média, de 61% (INCA, 2006). As pesquisas atuais sobre o diagnóstico e tratamento desta doença permitiram avanços que refletiram na melhora do prognóstico do câncer de mama.

Vários estudos têm demonstrado alterações genéticas no braço curto do cromossomo 9 (9p) em diversos tipos de tumores, incluindo os mamários. Trabalhos sobre a perda de heterozigose (LOH) nesta região nos permitem sugerir o envolvimento de genes supressores tumorais conhecidos, no início e progressão do câncer em geral e/ou do câncer de mama, como o gene *CDKN2A*, que codifica a proteína CDKN2A, envolvida no controle do ciclo celular. Além disso, a LOH em uma determinada região cromossômica também nos permite inferir a presença de novos genes supressores de tumor envolvidos na etiologia do câncer, sendo importante para a pesquisa de novos genes ainda não descritos.

No presente trabalho, será analisado o envolvimento de perdas de heterozigose no braço curto do cromossomo 9 em pacientes com cânceres mamários esporádicos, identificados histopatologicamente. Espera-se que a análise de marcadores moleculares microssatélites na região em questão possa auxiliar no diagnóstico precoce das lesões, no prognóstico da doença e na avaliação dos procedimentos terapêuticos mais adequados aos pacientes com estes tipos de tumores, além de possibilitar a busca de alterações genéticas envolvidas nos estágios iniciais da doença.

4. OBJETIVOS

Alterações no braço curto do cromossomo 9 (9p) ocorrem em vários tipos de câncer, incluindo os carcinomas mamários. A fim de testar a hipótese de que perdas alélicas em 9p possam estar relacionadas ao desenvolvimento de tumores mamários, temos como objetivos específicos:

- Caracterização epidemiológica e histopatológica da amostra;
- Determinar a frequência de perda de heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélite (IM) em cinco marcadores microssatélites mapeados em 9p em 230 amostras de carcinomas mamários;
- Verificar se a presença ou ausência de LOH está igualmente distribuída em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos;
- Analisar os resultados obtidos em relação aos dados disponíveis na literatura.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado com amostras de sangue periférico e de tecido tumoral de 229 pacientes com carcinomas primários de mama não tratados. Para uma paciente foram obtidas duas amostras tumorais, sendo a segunda na ocasião de recorrência da doença, totalizando 230 tumores de diferentes subtipos. As amostras foram obtidas no Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital de Clínicas de Curitiba (Paraná), após procedimento cirúrgico. O trabalho tem aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças, com registro no CONEP n. 7220, parecer n. 251/2003 de 20 de fevereiro de 2003.

Cada paciente recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e os formulários para a assinatura do Consentimento Informado Livre e Esclarecido e Formulário de História Pessoal (ANEXOS 01 e 02), para obtenção de informações pertinentes ao trabalho, como estilo de vida, local de nascimento, origem étnica, idade, ocupação e história familiar de câncer, entre outras. Nem todas as pacientes responderam por completo o questionário de História Pessoal, tornando o total de informações disponíveis variável em cada item.

As amostras de tecido tumoral e de sangue periférico de cada paciente foram utilizadas na análise de perda de heterozigose (LOH) na região 9p como casos e controles, respectivamente.

5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DE TECIDO TUMORAL

As coletas de sangue periférico foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Foram coletados cerca de 10 ml de sangue de cada indivíduo, o qual foi colocado imediatamente em tubos estéreis *Vacutainer* (BD) contendo 7,2 mg de K₂ EDTA, e mantidos a 4°C até o processamento.

Para o processamento do sangue, cerca de 5 ml de sangue periférico foram centrifugados com 14 ml de tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris; 110,2g de MgCl₂; 5,8 g de

NaCl e água destilada) a 2000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Este processo foi repetido até obter um botão de glóbulos brancos, livre de hemácias, ao qual foram adicionadas três gotas da solução PBS e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O tubo foi armazenado em geladeira até o momento da extração do DNA genômico.

As amostras de tecido tumoral foram coletadas pelo médico responsável no momento da retirada cirúrgica do tumor. Um fragmento do material coletado foi encaminhado para a análise histopatológica. Outro fragmento foi encaminhado para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da Universidade Federal do Paraná. Os fragmentos de tumor foram processados (retirada manual de tecidos que não os tumorais e fragmentação em pedaços menores com o auxílio de tesouras e pinças estéreis), colocados em frascos estéreis identificados e estocados em condições ideais de temperatura e conservação (-80 °C), para posterior extração do DNA.

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA SANGÜÍNEO E TUMORAL

O método de extração do DNA sanguíneo utilizado foi o de *salting out*, conforme o protocolo de BIGNON e FERNANDEZ-VINÃ (1997), que permite a obtenção de DNA de alto peso molecular. Após o processamento do sangue, as amostras são incubadas a 60° C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5X, 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de solução SDS 20% e 240 µl de água ultrapura. Em seguida são adicionados 100 µl de solução saturada de NaCl (6M) para a precipitação protéica, seguido de centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos) e aproveitamento somente do sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, realiza-se a precipitação do DNA com a adição de etanol absoluto (segue centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos), descarte do sobrenadante, e adição de etanol 70% (aproximadamente 1,0 ml de cada), seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Ao final do processo, as amostras de DNA são diluídas em 100 µl de água ultrapura e armazenadas a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

O método de extração do DNA tumoral utilizado foi o de fenol-clorofórmio. Em um tubo de microcentrífuga com os fragmentos do tumor são adicionados 80 μL de tampão da proteinase K 5X, 40 μL de solução de proteinase K (10mg/ml), 20 μL de solução de SDS 20% e 240 μL de água ultrapura. A mistura é homogeneizada em agitador tipo Vortex, seguida de incubação no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Na seqüência são adicionados 500 μL de fenol saturado pH 8,0 e 400 μL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O tubo é centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. São adicionados 50 μL de acetato de sódio 3M e 1 ml de etanol absoluto para a precipitação do DNA, com centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante é descartado e em seguida, são adicionados 500 μL de etanol 70%. O tubo é invertido delicadamente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação. O sobrenadante é desprezado e o tubo é colocado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 minutos para que ocorra a evaporação da água. Após, a amostra de DNA é ressuspensa em 30 a 50 μL de água ultrapura e retorna ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, para que a solução de DNA fique homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA é armazenada a -20°C.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *Gene Quant pro (RNA/DNA calculator)*. A leitura para quantificação e pureza é procedida em comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Para uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão da densidade óptica OD260/OD280 deverá estar entre 1,6 e 1,8.

Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/ μL .

5.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos marcadores de microssatélites em regiões específicas em 9p. Foram utilizados iniciadores específicos marcados com fluorescência para amplificar os marcadores de microssatélites do cromossomo 9. O QUADRO 01 apresenta informações sobre a localização cromossômica, número de nucleotídeos, frequência de heterozigose, tamanho em pares de bases (pb), os iniciadores e o fluorocromo utilizado para cada marcador microssatélite.

Marcador	Localização	Nucleotídeos (início – fim)	Heterozigose (Genome Database)	Tamanho (pb)	Iniciadores	Fluorocromo
D9S1749	9p21.3	21.792.942 – 21.793.069	0,9400	100 – 180	AGGAGAGGGTACGCTTGCAA (marcado) TACAGGGTGCGGGTGCAGATAA	HEX
D9S1748	9p21.3	21.983.775 – 21.983.894	0,8700	90 – 140	CACCTCAGAAGTCAGTGAGT (marcado) GTGCTTGAAATACCCTTTCC	6-FAM
D9S171	9p21.3	24.456.800 – 24.456.974	0,8043	130 – 200	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT (marcado) ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	HEX
D9S169	9p21.2	27.228.648 – 27.228.922	0,8386	220 – 300	AGAGACAGATCCAGATCCCA (marcado) TAACAACCTCACTGATTATTTAAGGC	HEX
D9S200	9p13.1	38.061.253 – 38.061.458	0,8300	90 – 150	GCATTTACAGGAAATAATCTAAGG (marcado) CCTCTCTGCATGCCCCAG	6-FAM

QUADRO 01 - MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS UTILIZADOS

FONTE: o autor (2009)

Todos os produtos de amplificação foram obtidos utilizando as mesmas condições, conforme descrito no QUADRO 02:

Reagentes	Concentração	Concentração na Reação	Volume na Reação
DNA molde	20,0 ng/μl	40,0 ng	2,0 μl
Tampão	10,0 X	1,0 X	1,0 μl
MgCl ₂	50,0 mM	1,0 mM	0,2 μl
dNTPs	2,0 mM de cada	0,1 mM de cada	0,5 μl
Iniciador <i>forward</i>	8,0 mM	0,8 mM	1,0 μl
Iniciador <i>reverse</i>	8,0 mM	0,8 mM	1,0 μl
Taq DNA polimerase	5,0 U/ μl	0,5 U	0,1 μl
H ₂ O Ultra Pura		Para completar 10,0 μl de reação	10,0 μl

QUADRO 02 - COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE PCR

FONTE: o autor (2009)

Os ciclos de amplificação foram: 96°C por 5 minutos (desnaturação do DNA inicial); 30 ciclos de 96°C por 20 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores) e 72°C por 40 segundos (extensão); 72°C por 20 minutos (extensão final), usando termociclador *Eppendorf Mastercycle Gradient*.

Após a amplificação por PCR, o número das amostras e as condições de corrida são transferidos para o computador para a análise. Em seguida, a placa de injeção contendo as amostras é montada. Prepara-se primeiramente o *Mix Loading Solution*, uma solução contendo 999 μL de água ultrapura e 1 μL de TWEEN 20, com uma rápida centrifugação antes de prosseguir. Desta solução são selecionados 785,4 μL e transferidas para outro tubo de microcentrífuga. Neste último são adicionados 30,6 μL do marcador molecular e centrifugado. Na seqüência, 98 μL da solução são acondicionados na fileira 1 da placa de injeção e 8 μL distribuídos nos demais poços, completando-se com 2 μL do produto de PCR, totalizando 10 μL por poço. As amostras contidas na placa são então desnaturadas a 94°C por 3 minutos e acondicionadas no gelo para que não renaturem. Após uma pré-corrída, a placa é então levada ao seqüenciador *MEGABACE 1000*, previamente programado para genotipagem.

As condições de corrida são: injeção a 3KV por 80 segundos e corrida a 8KV por 80 minutos. Após a eletroforese na presença do marcador padrão ET-ROX 400 (*Amersham Biosciences*), os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *Software Fragment Profiler 1.2* (*Amersham Biosciences*).

5.5 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)

Os marcadores informativos para cada paciente foram avaliados quanto à presença ou ausência de LOH no tecido tumoral. Amostras cujos marcadores apresentaram-se homozigotos no sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador (FIGURA 07).

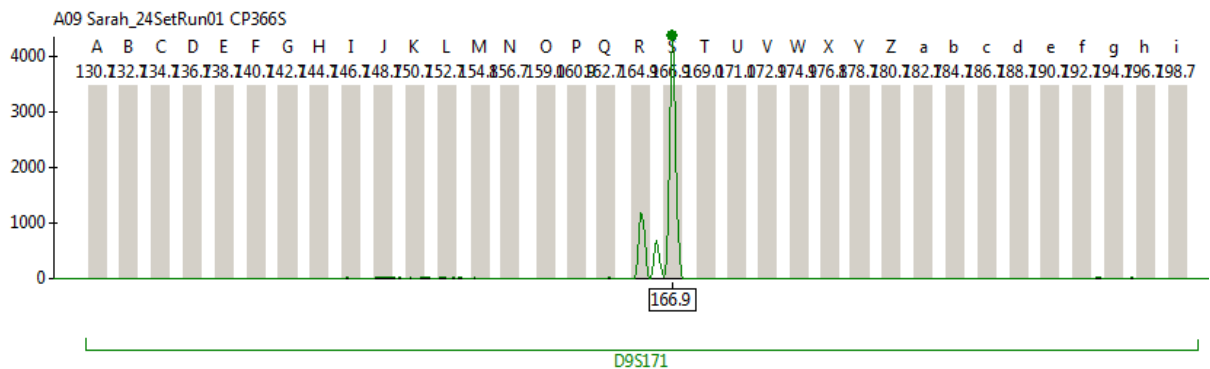


FIGURA 07 - INDIVÍDUO HOMOZIGOTO NO TECIDO NORMAL PARA O MARCADOR D9S171
 FONTE: o autor (2009)

A LOH é determinada matematicamente utilizando-se a seguinte fórmula, conforme SCHWARZENBACH *et al.*, 2007:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}}$$

O alelo 1 é o que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 é o que possui maior tamanho em pares de bases. Um valor de $\text{LOH} \leq 0,60$ indica que a amostra tumoral apresenta pelo menos 40% de perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de $\text{LOH} \geq 1,67$ indica perda de pelo menos 40% do alelo de menor tamanho na amostra tumoral. Foi considerada LOH quando o valor obtido foi menor ou igual a 0,60 ou maior ou igual a 1,67 (FIGURAS 08 e 09).

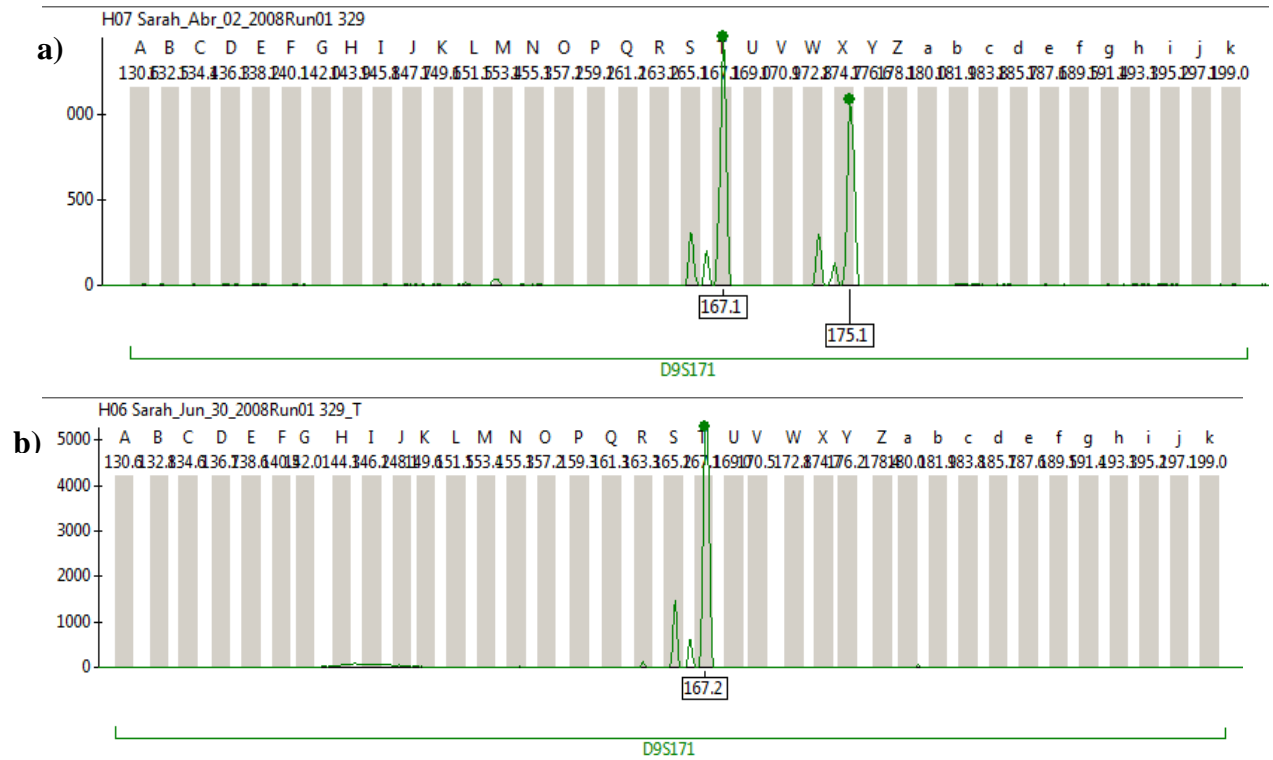


FIGURA 08 – INDIVÍDUO COM LOH TOTAL

FONTE: o autor (2009)

LEGENDA: **a)** indivíduo heterozigoto no tecido normal para o marcador D9S171 e, **b)** com perda completa do alelo de maior tamanho no tecido tumoral (LOH).

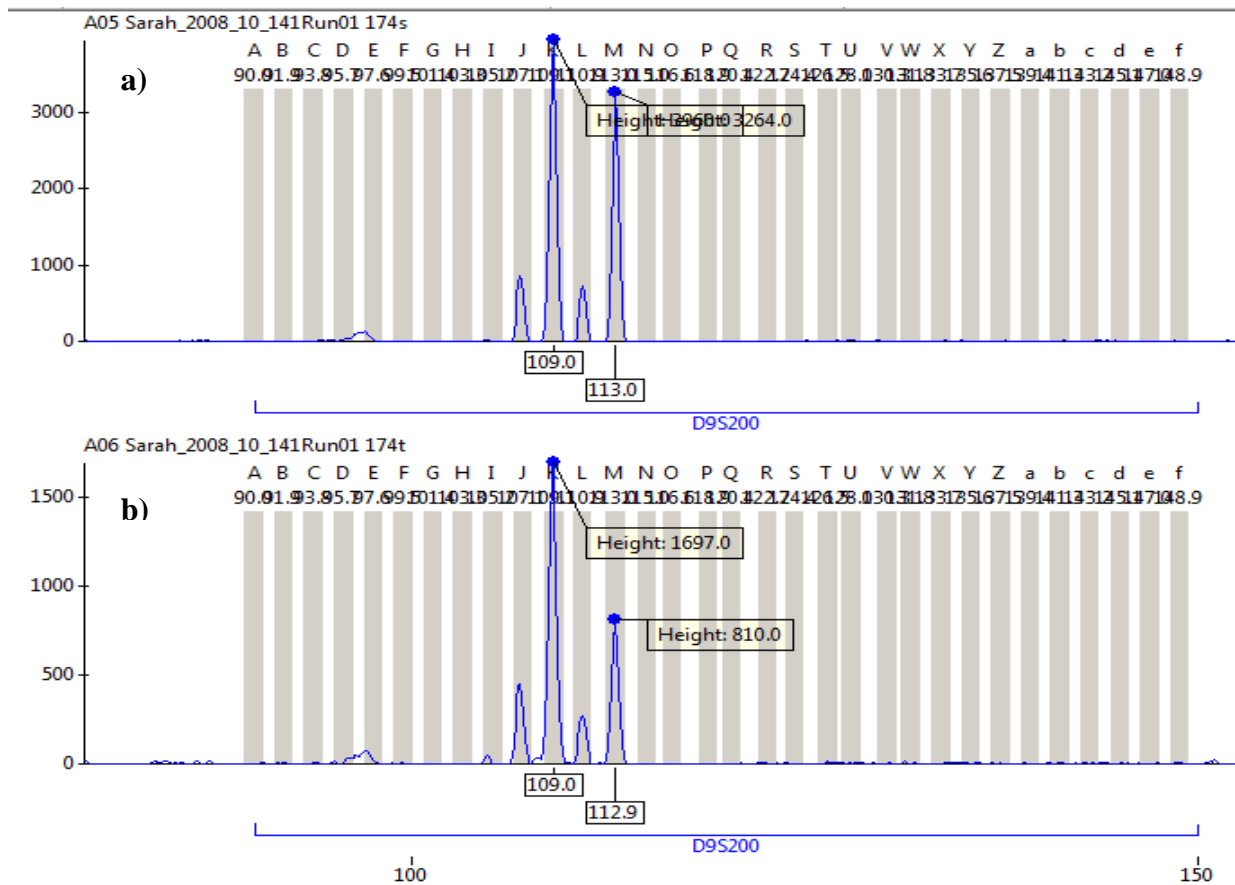


FIGURA 09 – INDIVÍDUO COM LOH PARCIAL

FONTE: o autor (2009)

LEGENDA: **a)** indivíduo heterozigoto no tecido normal para o marcador D9S200 e, **b)** com perda parcial do alelo de maior tamanho no tecido tumoral (LOH).

Todas as análises de LOH foram repetidas, e só foi considerada LOH quando os resultados obtidos através da fórmula citada anteriormente foram compatíveis nas duas análises, e excluídas as amostras nas quais isto não ocorreu (16/106).

5.6 ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (IM)

Foram consideradas portadoras de IM as amostras que tiveram redução ou expansão no tamanho de um dos alelos no tecido tumoral quando comparado ao DNA do sangue periférico (FIGURA 10). As pacientes que apresentaram IM não foram analisadas quanto à perda de heterozigose, pois devido à metodologia utilizada neste trabalho não seria adequado aplicar as fórmulas matemáticas de análise de LOH para comparar alelos com alteração no número de bases, uma vez

que o tamanho do fragmento influencia na altura e área dos picos. Dessa forma, os casos positivos para IM foram considerados não informativos nas análises de LOH.

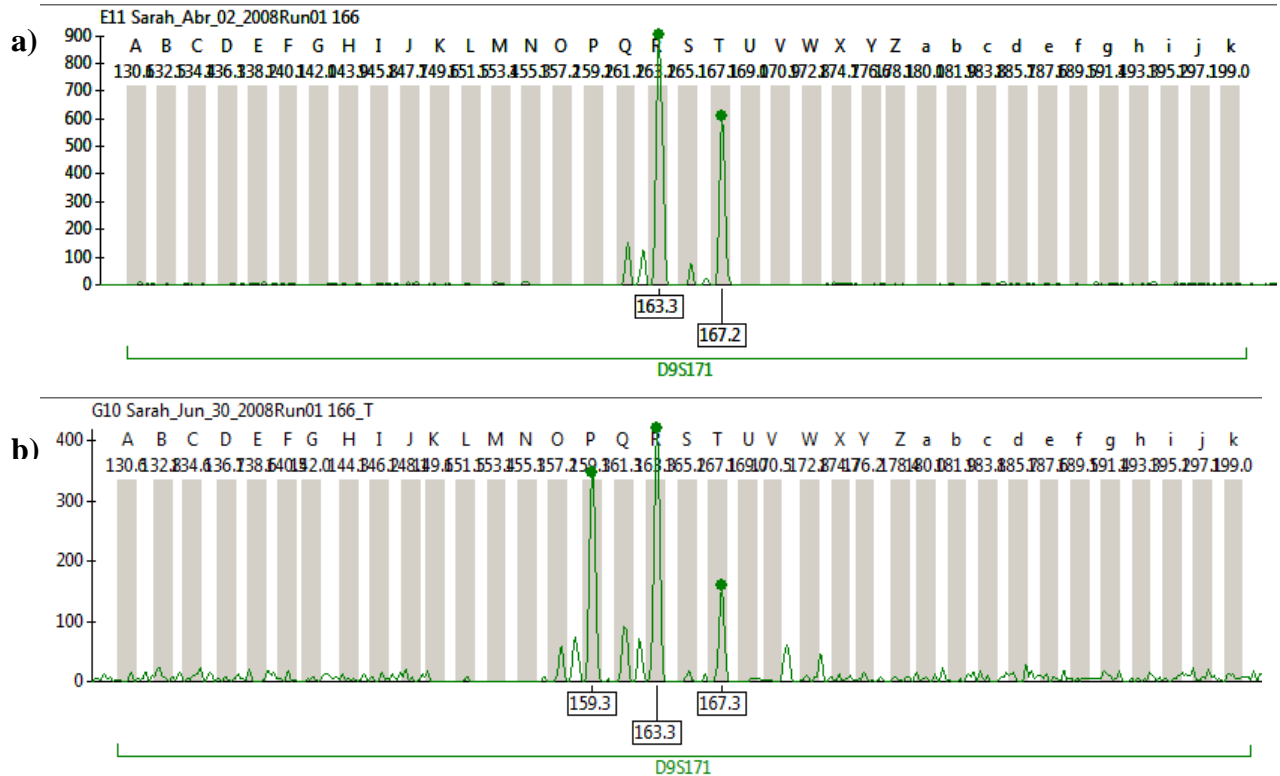


FIGURA 10 – INDIVÍDUO COM IM

FONTE: o autor (2009)

LEGENDA: **a)** INDIVÍDUO heterozigoto no tecido normal para o marcador D9S171 e, **b)** com instabilidade de microssatélite (IM) no tecido tumoral.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado em situações em que se admitiu a hipótese nula ($p=q$) de ocorrência de dois eventos e para avaliar a homogeneidade da distribuição das variáveis. O teste *t* e da variância (Fisher) foram utilizados para as comparações entre as médias e o de Bartlett para obter informações sobre a homogeneidade das variâncias. O teste exato de Fisher foi empregado em tabela de contingência 2X2 na qual as amostras eram de tamanho pequeno, e o Teste G foi empregado nas mesmas situações em tabelas de contingência superiores a 2X2. O grau de dependência de uma variável em função de outra foi analisado pelo coeficiente de regressão (b). As fórmulas utilizadas podem ser encontradas em BEIGUELMAN (1988).

6. RESULTADOS

6.2 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DA AMOSTRA

A média de idade das pacientes foi de $56,50 \pm 13,48$ anos ($n= 228$, pois duas amostras eram de uma mesma paciente e de uma das pacientes não se obteve a idade). Destas, 82 (36%) apresentaram idade ≤ 50 anos, e 146 (64%) > 50 anos.

A média da idade da menarca ($n= 99$) foi de $13,09 \pm 1,70$ anos, e da menopausa ($n= 86$) de $49,16 \pm 4,34$ anos. A diferença entre a idade da menarca e da menopausa, que representa o tempo de exposição ao estrogênio endógeno ($n= 73$), foi de $35,94 \pm 4,77$ anos.

Foram obtidas informações sobre o histórico reprodutivo de 109 pacientes, das quais 15 (13,76%) eram nulíparas e 94 (86,24%) tiveram filhos, com média da idade da primeira gestação de $23,78 \pm 4,75$ anos ($n= 50$), e a média de filhos nascidos vivos foi de $2,96 \pm 2,00$ por paciente ($n= 94$).

Quanto ao uso de contraceptivos hormonais (pílula anticoncepcional), foram obtidas informações de 60 pacientes, das quais 31 (51,67%) não fizeram uso de pílula, e 29 (48,33%) utilizavam ou já tinham feito o uso. Das 26 pacientes informativas, a média de tempo de uso foi de $9,84 \pm 7,92$ anos.

As informações sobre o hábito tabagista foram obtidas de 62 pacientes, sendo que 44 (70,97%) eram não fumantes e 18 (29,03%), fumantes.

A TABELA 01 apresenta a classificação histopatológica dos 230 tumores que constituíram a amostra.

TABELA 01 - TIPOS HISTOLÓGICOS DOS 230 TUMORES DE MAMA ANALISADOS

Tipo Histológico	n	%
Carcinoma Ductal Invasor	183	79,56
Carcinoma Lobular Invasor	14	6,09
Carcinoma Ductal sem especificação	9	3,91
Carcinoma Medular	5	2,17
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	4	1,74
Adenocarcinoma	2	0,87
Carcinoma Mucinoso	2	0,87
Carcinoma Tubular	2	0,87
Carcinomas Túbulo Ductal	2	0,87
Carcinoma Túbulo Lobular	2	0,87
Outros subtipos*	5	2,17
Total	230	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes.

*Outros subtipos: carcinoma ducto lobular invasor, carcinoma papilífero invasor, carcinoma metaplásico, carcinoma lobular sem especificação e carcinoma lobular misto ou pleomórfico, uma amostra de cada subtipo.

O tumor era unilateral na maioria (n= 121) das pacientes com informação (98,7%) e bilateral em três casos (1,30%).

As informações sobre a média de idade das pacientes, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos axilares, estágio de diferenciação tumoral, e receptores hormonais estão apresentadas na TABELA 02. Deve-se levar em conta que a amostra é viciada em relação ao tamanho do tumor, uma vez que só foram recebidas amostras suficientemente grandes para a análise histopatológica e as posteriores análises genéticas realizadas neste trabalho. Não foram recebidos tumores muito pequenos, pois estes só foram encaminhados aos exames histopatológicos de rotina. Sendo assim, não realizamos análises em relação ao tamanho tumoral.

TABELA 02 – CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DOS TUMORES

Características	Nº pacientes (%)
Idade (média)	56,50 ± 13,48 anos
≤ 50 anos	82 (36%)
> 50 anos	146 (64%)
Tamanho do tumor (média)	34,26 ± 17,36 mm
Envolvimento de linfonodos	
Positivo	95 (42,6%)
Negativo	128 (57,4%)
Estágio de diferenciação do tumor	
Grau I	32 (14,68%)
Grau II	120 (55,05%)
Grau III	66 (30,27%)
Receptor de estrogênio (RE)	
Positivo	129 (71,27%)
Negativo	52 (28,73%)
Receptor de progesterona (RP)	
Positivo	87 (69,6%)
Negativo	38 (30,4%)
Amplificação do <i>HER2</i>	
Positiva	46 (33,82%)
Negativa	90 (66,18%)

FONTE: o autor (2009)

Os receptores de células tumorais foram negativos em 17 (14,41%) de 118 pacientes analisadas para os três receptores, o que as caracterizou como triplo-negativas (RE-/RP-/HER2-). Todas apresentaram o subtipo histológico de Carcinoma Ductal Invasor.

Para 5 pacientes (2,18%) obteve-se informação de óbito pela doença, conforme indicado no ANEXO 03.

6.2 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH) E INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE (IM)

Nas análises de LOH e IM, foram excluídas 53 amostras (n= 177) por não apresentarem marcadores informativos para nenhum dos locos utilizados no estudo (homozigotas ou que não amplificaram por PCR). Os dados de LOH para cada uma das pacientes analisadas estão apresentados no ANEXO 04.

O número de pacientes analisadas para cada marcador microssatélite variou devido às dificuldades de amplificação do DNA de algumas amostras, principalmente tumorais.

A frequência de heterozigose variou de 70,54% para o loco D9S171 a 90,23% para o loco D9S1749. O número de pacientes homozigotas, heterozigotas e as frequências de heterozigose obtidas estão apresentados na TABELA 03, observando-se que as frequências de heterozigose não diferiram significativamente em relação às frequências obtidas conforme os dados do *GENOME DATABASE* (<http://www.gdb.org>) ($\chi^2_4= 1,1$; $p>0,80$).

TABELA 03 - FREQUENCIAS DE HETEROZIGOSE NA AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO

Marcadores	n (230)	HO (n)	HE (n)	HE%	HE (n) conforme GDB	GDB%
D9S1749	215	21	194	90,23%	202	94,00%
D9S1748	220	33	187	85,00%	191	87,00%
D9S171	224	66	158	70,54%	180	80,43%
D9S169	208	31	177	85,10%	174	83,86%
D9S200	224	52	172	76,79%	186	83,00%

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** - número de pacientes, **HO** - homozigotos, **HE** - heterozigotos, **HE%** - frequência de heterozigotos em porcentagem, **GDB%** - frequência de heterozigose no *Genome Database*.

A LOH foi observada em todos os locos analisados, variando de 10,29% para o marcador D9S200 a 15,97% para o marcador D9S1749. A IM também foi observada em todos os locos analisados, com frequências variando de 1,29% para o marcador D9S200 a 3,68% para o marcador D9S169. As frequências de LOH e IM para cada um dos marcadores analisados estão apresentadas na TABELA 04, e ambas se distribuíram igualmente entre todos os marcadores ($\chi^2_4=2,23$; $p>0,50$ para LOH e Teste G= 2,62; $p>0,60$ para IM).

TABELA 04 - FREQUENCIAS DE LOH E IM NOS CINCO MARCADORES MICROSSATÉLITES EM 9p

Marcador	Pacientes Analisados (n)	Casos Informativos (%)	LOH% (LOH/casos informativos)	IM% (IM/casos informativos)
D9S1749	215	119 (55,35)	15,97 (19/119)	1,68 (2/119)
D9S1748	220	157 (71,36)	11,46 (18/157)	3,18 (5/157)
D9S171	224	156 (69,64)	11,54 (18/156)	1,92 (3/156)
D9S169	208	136 (65,38)	10,29 (14/136)	3,68 (5/136)
D9S200	224	155 (69,20)	12,90 (20/155)	1,29 (2/155)
Estatística	-	-	$\chi^2_4=2,23$; $p>0,50$	Teste G= 2,62; $p>0,60$

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **LOH** - Perda de Heterozigose, **IM** - Instabilidade de Microsatélite.

Das 177 amostras informativas, em 44 (24,86%) observou-se LOH em pelo menos um marcador, e 15 (8,47%) apresentaram IM em pelo menos um marcador. Em 120 (67,80%) amostras não se observou alterações (LOH ou IM) nos

marcadores. Nas demais análises não foram feitas correlações quanto a presença ou ausência de IM, devido ao pequeno número de pacientes com IM em pelo menos um marcador.

Em relação aos subgrupos histológicos, das 151 amostras de carcinomas ductais (incluindo amostras de carcinoma ductal invasor e carcinoma ductal *in situ*), 40 (26,49%) apresentaram LOH em pelo menos um marcador. Das 9 amostras de carcinomas lobulares (incluindo amostras de carcinoma lobular invasor e carcinoma lobular misto) e 17 amostras de carcinomas de outros subtipos (incluindo amostras de adenocarcinoma, carcinoma mucinoso, carcinoma medular, carcinoma ducto lobular, carcinoma papilífero, carcinoma tubular, carcinoma túbulo-lobular e carcinoma misto), 2 amostras de cada grupo apresentaram LOH em pelo menos um marcador (22,22% e 11,76%, respectivamente).

A média de idade das pacientes que não apresentaram LOH em nenhum dos marcadores foi de $57,00 \pm 12,78$ anos, e das que apresentaram LOH em pelo menos um marcador foi de $58,52 \pm 14,44$ anos, não se observando diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($t = 0,66$; $p > 0,50$). Também não se observaram diferenças significativas entre as médias de idade de pacientes com e sem LOH para cada um dos marcadores (TABELA 05).

TABELA 05 – MÉDIA DE IDADE DAS PACIENTES COM E SEM LOH PARA CADA UM DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES

	D9S1749		D9S1748		D9S171		D9S169		D9S200	
	n	Média ± desvio padrão	n	Média ± desvio padrão	n	Média ± desvio padrão	n	Média ± desvio padrão	n	Média ± desvio padrão
Com LOH	19	62,74 ± 14,05	19	57,42 ± 12,24	18	57,89 ± 14,09	14	58,07 ± 14,77	20	59,65 ± 14,97
Sem LOH	100	57,45 ± 12,63	138	57,14 ± 13,34	138	57,33 ± 13,29	122	56,93 ± 12,8	135	57,06 ± 13,16
Teste <i>t</i>	$t = 1,64$; $p > 0,10$		$t = 0,09$; $p > 0,90$		$t = 0,17$; $p > 0,90$		$t = 0,31$; $p > 0,70$		$t = 0,84$; $p > 0,40$	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **Teste t** – teste *t* de Student.

6.2.1 Análises de LOH e os parâmetros clínicos

Para os dados de LOH e os parâmetros clínicos, não foram feitas análises para cada um dos marcadores devido ao pequeno tamanho amostral, o que diminuiria o poder do teste.

A média do tempo de exposição ao estrogênio endógeno (idade da menopausa – idade da menarca) foi de $35,33 \pm 4,96$ anos nas pacientes com LOH ($n= 12$) em pelo menos um dos marcadores e de $36,95 \pm 4,14$ anos nas pacientes sem LOH ($n= 40$) em nenhum dos marcadores, não havendo diferença significativa entre os grupos ($t= 1,14$; $p>0,20$). Outro parâmetro utilizado para avaliar a exposição ao estrogênio endógeno foi a média de idade da primeira gestação, que também não apresentou diferença significativa entre os grupos ($t= 0,31$; $p>0,70$). A exposição ao estrogênio exógeno (avaliada pela utilização de contraceptivo hormonal) não diferiu estatisticamente ($\chi^2_1= 0,06$; $p>0,80$) entre as pacientes que utilizavam ($n= 31$) e que não utilizavam ($n= 29$) contraceptivos orais, e não pode ser avaliada entre os grupos com e sem LOH, pois havia informação referente a somente uma paciente entre as portadoras de LOH.

A dependência das variações do tamanho dos tumores em função do tempo de exposição ao estrogênio endógeno foi avaliada pelo coeficiente de regressão. O valor de b foi igual a $-0,004 \pm 0,012$, com $t= 0,33$; $p>0,70$, indicando que as variações que ocorrem no tamanho dos tumores não dependem do tempo de exposição das pacientes ao estrogênio endógeno.

Quanto ao hábito tabagista, a frequência de pacientes fumantes ($n= 18 - 29,03\%$) e não fumantes ($n= 44 - 70,97\%$) diferiu significativamente ($\chi^2_1= 10,9$, $p<0,001$), o mesmo não ocorrendo entre os grupos com e sem LOH em pelo menos um marcador (3 e 8, respectivamente) e fumantes ou não fumantes (3 e 25, respectivamente), de acordo com o teste exato de Fisher ($p>0,99$).

6.2.2 Análises de LOH e os parâmetros histopatológicos

A frequência de LOH em pelo menos um marcador se distribuiu igualmente nas pacientes com e sem metástases em linfonodos axilares ($\chi^2_1 = 1,86$; $p > 0,10$). Também, a análise em cada marcador não apresentou resultados significativos (TABELA 06).

TABELA 06 – FREQUENCIA DE LOH ENTRE PACIENTES COM E SEM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES

Marcador	Metástase	Com LOH (n)	Sem LOH (n)	Qui-quadrado
D9S1749	Ausência	8	39	$\chi^2_1 = 0,09$; $p > 0,70$
	Presença	10	57	
D9S1748	Ausência	9	54	$\chi^2_1 = 0,54$; $p > 0,30$
	Presença	9	78	
D9S171	Ausência	7	62	$\chi^2_1 = 0,20$; $p > 0,50$
	Presença	10	70	
D9S169	Ausência	3	55	$\chi^2_1 = 1,99$; $p > 0,10$
	Presença	9	64	
D9S200	Ausência	10	55	$\chi^2_1 = 0,77$; $p > 0,30$
	Presença	9	76	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **Qui-quadrado** – teste de qui-quadrado.

A frequência de LOH em pelo menos um marcador se distribuiu igualmente entre os graus histológicos dos tumores ($\chi^2_2 = 2,71$; $p > 0,20$), assim como na análise para cada marcador (TABELA 07).

TABELA 07 – FREQUENCIA DE LOH ENTRE OS GRAUS HISTOLÓGICOS DOS TUMORES

Marcador	Graus Histológicos	Com LOH (n)	Sem LOH (n)	Qui-quadrado
D9S1749	Grau I	2	16	$\chi^2_{2} = 0,50; p > 0,70$
	Grau II	11	51	
	Grau III	5	29	
D9S1748	Grau I	3	19	$\chi^2_{2} = 0,07; p > 0,95$
	Grau II	10	73	
	Grau III	5	39	
D9S171	Grau I	2	20	$\chi^2_{2} = 0,54; p > 0,70$
	Grau II	11	73	
	Grau III	4	39	
D9S169	Grau I	0	15	$\chi^2_{2} = 4,27; p > 0,20$
	Grau II	11	65	
	Grau III	2	36	
D9S200	Grau I	0	22	$\chi^2_{2} = 4,35; p > 0,20$
	Grau II	14	68	
	Grau III	6	39	
Total	Grau I	3	21	$\chi^2_{2} = 2,71; p > 0,20$
	Grau II	25	70	
	Grau III	15	35	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes, **Qui-quadrado** – teste de qui-quadrado.

Quanto ao tamanho tumoral, a média foi de $34,47 \pm 15,90$ mm nas pacientes com LOH (n= 40) em pelo menos um marcador, e de $34,23 \pm 18,76$ mm nas pacientes sem LOH (n= 119) em nenhum dos marcadores. Não houve diferença significativa ($t = 0,01; p > 0,90$). Na análise para cada marcador, apenas tumores com LOH em D9S200 tiveram média de tamanho superior a tumores sem LOH nesse marcador ($t = 2,81; p < 0,05$) (TABELA 08). As diferenças entre as médias foram avaliadas pela análise de variância (Fischer) (TABELA 09). O teste de Bartlett indicou que as variâncias eram homogêneas ($\chi^2_{9 \text{ corr.}} = 6,33; p > 0,70$), e os valores de F não foram significativos na análise entre os marcadores ($F = 0,12; p > 0,05$), entre presença ou ausência de LOH ($F = 1,96; p > 0,05$), na interação ($F = 1,54; p > 0,05$) e entre todos os grupos ($F = 0,95; p > 0,05$).

TABELA 08 – MÉDIA DO TAMANHO DO TUMOR (mm) EM PACIENTES COM E SEM LOH EM CADA MARCADOR

	D9S1749		D9S1748		D9S171		D9S169		D9S200	
	n	Média± desvio Padrão	n	Média± desvio Padrão	n	Média± desvio Padrão	n	Média± desvio Padrão	n	Média± desvio Padrão
Com LOH	19	35,37± 16,67	18	34,44 ± 16,7	17	32,71± 14,82	14	33,29± 16,78	17	44,53± 12,54
Sem LOH	92	33,8 ± 17,15	123	32,76± 16,96	125	33,68± 17,59	112	34,47± 18,02	126	32,13± 17,58
Teste t	$t = 0,36; p > 0,70$		$t = 0,39; p > 0,60$		$t = 0,22; p > 0,80$		$t = 0,23; p > 0,80$		$t = 2,81; p < 0,05$	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes, **Teste t** – teste t de Student.

TABELA 09 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES CONFORME A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LOH EM CADA MARCADOR

Varição	G.L.	SQ	$s^2(x)$	F
Entre marcadores	4	144,159	36,04	F= 0,12; p>0,05
Entre LOH e sem LOH	1	584,127	584,13	F= 1,96; p>0,05
Interação	4	1831,603	457,90	F= 1,54; p>0,05
Entre todos os grupos	9	2559,889	284,43	F= 0,95; p>0,05
Resíduo	653	194373,960	297,66	

FONTE: o autor (2009)

NOTA : **G.L.** – graus de liberdade, **SQ** – soma dos quadrados, **$s^2(x)$** – variância, **F** – teste F.

Em relação aos receptores hormonais, a frequência de LOH em pelo menos um dos marcadores não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com RE+ ou -, RP+ ou - e HER2+ ou -, como mostra a TABELA 10.

TABELA 10 – FREQUENCIA DE LOH EM PELO MENOS UM DOS MARCADORES E OS RECEPTORES HORMONAIS

	Com LOH (n)	Sem LOH (n)	Qui-quadrado
RE +	26	71	$\chi^2_1 = 0,36$; p>0,50
RE -	9	32	
RP +	18	42	$\chi^2_1 = 1,26$; p>0,20
RP -	5	22	
HER2 +	7	25	$\chi^2_1 = 0,03$; p>0,80
HER2 -	15	49	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **Qui-quadrado** – teste de qui-quadrado.

As frequências de LOH entre os receptores hormonais não diferiram significativamente em cada marcador (TABELA 11).

TABELA 11 – FREQUENCIA DE LOH EM CADA MARCADOR E OS RECEPTORES HORMONAIS

		D9S1749 (n)	D9S1748 (n)	D9S171 (n)	D9S169 (n)	D9S200 (n)
RE +	Com LOH	11	10	10	10	12
	Sem LOH	57	73	74	70	74
RE -	Com LOH	4	4	6	3	3
	Sem LOH	24	34	32	23	33
Qui- quadrado		$\chi^2_1 = 0,05$ p>0,80	$\chi^2_1 = 0,06$ p>0,80	$\chi^2_1 = 0,34$ p>0,50	$\chi^2_1 = 0,02$ p>0,80	$\chi^2_1 = 0,74$ p>0,30
RP +	Com LOH	9	7	6	8	9
	Sem LOH	35	45	45	38	43
RP -	Com LOH	1	1	3	1	3
	Sem LOH	18	23	20	19	22
Qui- quadrado		$\chi^2_1 = 2,29$ p>0,10	$\chi^2_1 = 1,51$ p>0,20	$\chi^2_1 = 0,02$ p>0,80	$\chi^2_1 = 1,82$ p>0,10	$\chi^2_1 = 0,36$ p>0,50
HER2 +	Com LOH	3	3	4	3	2
	Sem LOH	21	24	23	19	27
HER2 -	Com LOH	6	5	4	4	9
	Sem LOH	37	52	53	46	46
Qui- quadrado		$\chi^2_1 = 0,03$ p>0,80	$\chi^2_1 = 0,12$ p>0,90	$\chi^2_1 = 1,29$ p>0,20	$\chi^2_1 = 0,55$ p>0,30	$\chi^2_1 = 1,49$ p>0,20

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **Qui-quadrado** – teste de qui-quadrado.

A frequência de LOH entre as amostras triplo-negativas foi de 11,76% (n=17).

6.2.3 Comparações das frequências de LOH com os dados da literatura

Inicialmente foi feita uma comparação das frequências de HO, HE, LOH e não LOH com o trabalho de PROPST (2007), do nosso grupo de pesquisa, com 74 carcinomas bucais de células escamosas (TABELA 12). Houve diferença significativa entre as frequências de HO nos dois trabalhos ($\chi^2_4= 12,60$; $p<0,05$), sendo que tais frequências foram maiores para todos os marcadores no trabalho de PROPST (2007).

TABELA 12 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS DE HO, HE, LOH e SEM LOH OBTIDAS, COM O TRABALHO DE PROPST (2007)

Marcador	HO (n)		HE (n)		LOH (%)		Sem LOH (%)	
	Oliveira, 2009	Propst, 2007	Oliveira, 2009	Propst, 2007	Oliveira, 2009	Propst, 2007	Oliveira, 2009	Propst, 2007
D9S1749	21	13	194	61	19(15,97)	16(21,31)	100(84,03)	58(78,69)
D9S1748	33	30	187	35	18(11,46)	19(28,57)	139(88,54)	46(71,43)
D9S171	66	25	158	40	18(11,54)	15(22,50)	138(88,46)	50(77,50)
D9S169	31	24	177	39	14(10,29)	19(30,77)	122(89,71)	44(69,23)
D9S200	52	16	172	50	20(12,90)	22(34,00)	135(87,10)	44(66,00)
Estatística	$\chi^2_4= 12,60$; $p<0,05$		$\chi^2_4= 6,25$; $p>0,10$		$\chi^2_4= 1,39$; $p>0,80$		$\chi^2_4= 8,26$; $p>0,05$	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes.

A frequência de LOH em 9p21-p13 observada neste trabalho também foi comparada com a de outros trabalhos com câncer de mama sem levar em consideração os marcadores microssatélites utilizados nas análises. Os resultados estão apresentados na TABELA 13, e as comparações foram feitas conforme o subtipo histológico da amostra, observando-se que não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras de carcinomas de vários subtipos e de carcinomas lobulares.

TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE LOH EM 9p OBTIDAS, COM OUTROS TRABALHOS DA LITERATURA

Trabalhos	LOH/total	LOH %	Subtipo Histológico	Estatística
Oliveira, 2009	44/177	24,86	Carcinomas de vários subtipos	$\chi^2_1 = 0,03$; p>0,80
Gourgoulis <i>et al.</i> , 1998	13/55	23,64	Carcinomas de vários subtipos	
Oliveira, 2009	2/9	22,22	Carcinomas lobulares	Teste Exato de Fisher= p>0,99
Huiping <i>et al.</i> , 1999	5/30	16,67	Carcinomas lobulares	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes. **Gorgoulis *et al.*, 1998** – análise de LOH em 9p21-p22 com 4 marcadores (D9S171 em comum) em 55 carcinomas mamários esporádicos; **Huiping *et al.*, 1999** – análise de LOH em 40 carcinomas lobulares usando um painel 62 marcadores (5 marcadores em 9p, D9S171 em comum) em diversos cromossomos.

As frequências de LOH e sem LOH para o marcador D9S171 foram comparadas com as descritas em outros trabalhos com tumores mamários, por ser o marcador mais comumente utilizado desta região (TABELA 14).

TABELA 14 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE LOH E SEM LOH OBTIDAS PARA O MARCADOR D9S171, COM OUTROS TRABALHOS DA LITERATURA

	Oliveira, 2009	Gorgoulis <i>et al.</i> , 1998	Ellsworth <i>et al.</i> , 2005	Schwarzenbach <i>et al.</i> , 2007	Estatística
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
D9S171					
LOH	18 (11,54)	4 (8,89)	3 (12,50)	7 (16,67)	$\chi^2_3 = 1,32$; p>0,70
Sem LOH	138 (88,46)	41(91,11)	21 (87,50)	35 (83,33)	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes. **Gorgoulis *et al.*, 1998** – análise de LOH em 9p21-p22 com 4 marcadores (D9S171 em comum) em 55 carcinomas mamários esporádicos; **Ellsworth *et al.*, 2005** – análise de LOH usando um painel de 52 marcadores microssatélites (D9S171 em comum) em 26 regiões cromossômicas comumente deletadas em 24 amostras pareadas de tumores primários de mama e metástases axilares; **Schwarzenbach *et al.*, 2007** - análise de LOH usando um painel de 7 marcadores (D9S171 em comum) em 6 cromossomos, em 40 amostras de tumores mamários não metastáticos e 48 de tumores metastáticos.

6.3 ANÁLISES ENTRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Na análise dos parâmetros histopatológicos conforme o subtipo histológico do tumor, as amostras foram divididas em dois grupos: carcinomas ductais (n= 196) e carcinomas lobulares (n= 16). Carcinomas de outros subtipos histológicos foram excluídos desta análise por não constituírem um grupo homogêneo.

A média de idade foi de 56,60 ± 13,94 anos para as pacientes com carcinomas ductais, e 57,44 ± 11,39 anos para as pacientes com carcinomas lobulares, não sendo observada diferença significativa entre as médias (Teste t= 0,22; p>0,80).

A média dos tamanhos dos carcinomas ductais e lobulares foi de $35,37 \pm 17,10$ mm e $35,31 \pm 17,4$ mm, respectivamente. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo Teste *t*, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre as médias ($t= 0,01$; $p>0,90$).

Entre as pacientes com informação de presença de metástases em linfonodos axilares, 108 (93,10%) tinham carcinomas ductais e 8 (6,90%) carcinomas lobulares. Entre as pacientes com informação de ausência de metástases em linfonodos axilares, 81 (92,05%) e 7 (7,95%) tinham carcinomas ductais e lobulares, respectivamente. A diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa pela análise do Teste exato de Fisher ($p>0,70$).

A TABELA 15 apresenta as frequências dos graus dos tumores e pacientes positivas e negativas para os RE, RP e amplificação do gene *HER2* nos subtipos histológicos.

TABELA 15 – GRAU DOS TUMORES, RECEPTORES HORMONAIS E AMPLIFICAÇÃO DO *HER2* QUANTO AO SUBTIPO HISTOLÓGICO

	Subtipo ductal n (%)	Subtipo lobular n (%)
Grau I	22 (11,70)	3 (21,43)
Grau II	107 (56,91)	10 (71,43)
Grau III	59 (31,38)	1 (7,14)
RE +	110 (70,51)	12 (100,00)
RE -	46 (29,49)	0 (-)
RP +	73 (67,59)	8 (88,89)
RP -	35 (32,41)	1 (11,11)
<i>HER2</i> +	43 (36,75)	1 (9,09)
<i>HER2</i> -	74 (63,25)	10 (90,91)

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes.

Houve diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição das pacientes positivas e negativas para o RE e os subtipos histológicos (Teste Exato de Fisher: $p<0,05$). Essa significância ocorreu porque todos os carcinomas lobulares da amostra eram positivos para o RE.

Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição dos graus histológicos (Teste G= 4,91; $p>0,05$), das frequências de pacientes positivas e negativas para o RP e para o *HER2* no conjunto dos dois grupos histológicos (Teste Exato de Fisher: $p>0,20$ e $p>0,05$, respectivamente).

A TABELA 16 apresenta as médias dos tamanhos dos tumores em relação aos parâmetros histopatológicos.

TABELA 16 – MÉDIA DOS TAMANHOS DOS TUMORES EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

	n	Média ± Desvio Padrão (mm)	Teste t
Ausência metástase	87	29,64 ± 15,22	t= 3,70
Presença metástase	115	38,38 ± 17,60	p<0,05
≤50 anos	72	35,08 ± 18,55	t= 0,52
>50 anos	134	33,83 ± 15,13	p>0,60
RE +	118	33,85 ± 16,30	t= 0,99
RE -	47	31,30 ± 11,75	p>0,30
RP +	78	32,24 ± 14,77	t= 0,45
RP -	31	33,58 ± 11,60	p>0,6
HER2 +	39	30,82 ± 13,16	t= 1,29
HER2 -	81	34,37 ± 14,58	p>0,20
Grau I	29	29,41 ± 13,94	F=1,38; p>0,05
Grau II	110	34,95 ± 18,66	
Grau III	58	35,48 ± 15,92	
Triplo -	17	35,82 ± 09,99	t= 1,42; p>0,10
Triplo +	20	31,05 ± 10,41	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes, **mm** – milímetros, **Teste t** – teste *t* de Student, **F** – teste F.

A média dos tamanhos dos tumores foi maior entre as pacientes que apresentaram metástases em linfonodos axilares do que entre as que não apresentaram (**t= 3,70; p<0,05**).

Em relação à idade da paciente, a média dos tamanhos dos tumores de pacientes com idade ≤ 50 anos não diferiu significativamente da média dos tamanhos dos tumores de pacientes com idade > 50 anos (t= 0,52; p>0,60). Com o objetivo de avaliar se o tamanho do tumor depende da idade das pacientes, realizou-se análise do coeficiente de regressão (n= 206). O valor de b foi igual a 0,005 ± 0,09, t= 0,55; p>0,5, indicando que as variações que ocorrem no tamanho dos tumores não dependem da idade das pacientes.

Quanto à presença dos receptores hormonais, a média dos tamanhos dos tumores não diferiu significativamente entre os tumores positivos e negativos dentro de cada marcador (t= 0,99; p>0,30 para o RE, t= 0,45; p>0,6 para o RP, t= 1,29; p>0,20 para o *HER2*).

Em relação ao grau histopatológico do tumor, a análise de variância não mostrou diferenças significativas nos tamanhos dos tumores de grau I, II e III (Teste de Bartlett: $\chi^2_{2corr.} = 4,96$; p>0,05; Análise de variância: F=1,38; p>0,05) (TABELA 17).

TABELA 17 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES CONFORME O GRAU HISTOLÓGICO

Varição	G.L.	SQ	$s^2(x)$	F
Entre graus	2	820,634	410,317	F= 1,38; p>0,05
Dentro de cada grau	194	57818,290	298,032	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: G.L. – graus de liberdade, SQ – soma dos quadrados, $s^2(x)$ – variância, F – teste F.

Quanto aos tumores triplo-negativos (RE-/RP-/HER2-), a média dos tamanhos não apresentou diferença estatisticamente significativa dos tumores triplo-positivos (RE+/RP+/HER2+) (TABELA 16) e dos não triplo-negativos (outras combinações) (TABELA 18). A TABELA 18 apresenta comparações entre a média de idade, presença ou ausência de metástases axilares e grau histológico entre tumores triplo-negativos e não triplo-negativos, todas não significativas.

TABELA 18 – CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DOS TUMORES TRIPLO – E NÃO TRIPLO -

	Triplo -	Não triplo -	Estatística
Idade	52,65 ± 10,73 (n=17)	57,74 ± 13,56 (n= 101)	$t= 1,47$; p>0,10
Tamanho	35,82 ± 9,99 (n= 17)	31,71 ± 14,57 (n= 86)	$t= 1,11$; p>0,20
Metástases			
Ausência	9 (52,94%)	49 (49%)	$\chi^2_1= 0,09$; p>0,70
Presença	8 (47,06%)	51 (51%)	
Grau			
I	2 (11,76%)	16 (16,16%)	$\chi^2_2= 0,69$; p>0,70
II	8 (47,06%)	52 (52,53%)	
III	7 (41,18%)	31 (31,31%)	

FONTE: o autor (2009)

A média de idade entre as pacientes que não apresentavam metástases em linfonodos axilares (n= 95) foi de 58,04 ± 13,98 anos, e entre as pacientes com metástases (n=127) foi de 54,86 ± 12,89 anos, havendo diferença significativa entre as mesmas ($t= 6,42$; $p<0,001$).

A média de idade das pacientes com tumores de grau I, II e III foi de 60,62 ± 13,18; 56,57 ± 13,28 e 54,86 ± 13,67 anos, respectivamente. As diferenças entre as médias foram avaliadas pela análise de variância (Fischer). O teste de Bartlett indicou que as variâncias eram homogêneas ($\chi^2_{2corr.}= 0,08$; p>0,95) e o valor de F não foi significativo (TABELA 19).

TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DE IDADE DAS PACIENTES CONFORME O GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR

Varição	G.L.	SQ	$s^2(x)$	F
Entre graus	2	717,063	358,531	F= 2,0005;
Dentro de cada grau	215	38532,740	179,222	p>0,14

FONTE: o autor (2009)

NOTA: G.L. – graus de liberdade, SQ – soma dos quadrados, $s^2(x)$ – variância, F – teste F.

Entre os tumores de grau I, II e III, 20 (21,74%), 50 (54,35%) e 22 (23,91%) não apresentavam metástases axilares, respectivamente. Entre os tumores com metástases, 10 (8,33%), 66 (55,00%) e 44 (36,67%) eram dos graus I, II e III, respectivamente. A distribuição da presença ou ausência de metástases axilares conforme o grau dos tumores não foi homogênea, com $\chi^2_2 = 9,34$; $p < 0,001$, sendo que nos tumores de grau III a frequência de metástases aumentou significativamente.

6.3.1 Comparações dos dados histopatológicos com outros da literatura

Os dados histopatológicos foram comparados com os de outras amostras já descritas, quanto à idade, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, grau de diferenciação do tumor, RE, RP e amplificação do *HER2* (TABELA 20). Foram encontradas diferenças significativas quanto ao envolvimento de linfonodos, RE, RP e amplificação do *HER2* nas análises entre todos os trabalhos. Nas comparações entre o nosso e cada um dos outros trabalhos para os parâmetros em questão, foram encontradas diferenças significativas nos seguintes casos:

- Envolvimento de Linfonodos – em relação ao trabalho de ARUN *et al.* (2005) ($\chi^2_1 = 8,91$; $p < 0,01$);
- RE – em relação ao trabalho de DENT *et al.* (2007) ($\chi^2_1 = 29,26$; $p < 0,001$) e KIM *et al.* (2008) ($\chi^2_1 = 11,40$; $p < 0,001$);
- RP - em relação ao trabalho de ARUN *et al.* (2005) ($\chi^2_1 = 7,00$; $p < 0,01$) e KIM *et al.* (2008) ($\chi^2_1 = 7,70$; $p < 0,01$);
- *HER2* - em relação ao trabalho de DENT *et al.* (2007) ($\chi^2_1 = 24,10$; $p < 0,001$).

TABELA 20 – COMPARAÇÕES ENTRE OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS COM OUTRAS AMOSTRAS JÁ DESCRITAS

	Oliveira, 2009 n (%)	Arun <i>et al.</i> , 2005 n (%)	Dent <i>et al.</i> , 2007 n (%)	Kim <i>et al.</i> , 2008 n (%)	Argos <i>et al.</i> , 2008 n (%)
Idade					
≤ 50 anos	82 (35,96)	33 (42,86)	-	-	-
> 50 anos	146 (64,04)	44 (57,14)	-	-	-
Envolvimento de linfonodos					
Positivo	95 (42,60)	19 (23,75)	510 (45,6)	-	-
Negativo	128 (57,40)	61 (76,25)	609 (54,4)	-	-
Grau					
Grau I	32 (14,68)	11 (14,86)	237 (19,9)	58 (17,16)	2 (13,33)
Grau II	120 (55,05)	43 (58,11)	616 (51,8)	184 (54,44)	7 (46,67)
Grau III	66 (30,27)	20 (27,03)	336 (28,3)	96 (28,40)	6 (40,00)
RE					
Positivo	129 (71,27)	52 (65)	1167 (86,6)	161 (55,81)	14 (87,5)
Negativo	52 (28,73)	28 (35)	180 (13,4)	128 (44,89)	2 (12,5)
RP					
Positivo	87 (69,6)	41 (51,25)	1000 (75,2)	159 (55,02)	10 (62,5)
Negativo	38 (30,4)	39 (48,75)	350 (24,8)	130 (44,98)	6 (37,5)
HER2					
Positivo	46 (33,82)	-	163 (16,4)	89 (26,33)	6 (42,9)
Negativo	90 (66,18)	-	831 (83,6)	249 (73,67)	8 (57,1)
Total	230	80	1421	338	16

FONTE: o autor (2009)

NOTA: **n** – número de pacientes; **Arun *et al.*, 2005** – 80 pacientes com tumores primários de mama, parafinizados; **Dent *et al.*, 2007** – 1421 carcinomas de mama invasivos e não triplo-negativos. **Kim *et al.*, 2008** – 338 pacientes com CDI, parafinizados; **Argos *et al.*, 2008** – 16 pacientes com carcinomas de mama invasivos frescos e congelados.

A TABELA 21 faz a mesma análise com amostras de tumores triplo-negativos, sendo que apenas quanto ao envolvimento de linfonodos axilares não foram encontradas diferenças significativas entre todos os trabalhos. Nas comparações entre o nosso e cada um dos outros trabalhos para os parâmetros em questão, foi encontrada diferença significativa no seguinte caso:

- Grau histológico - em relação ao trabalho de KREIKE *et al.* (2007) (**Teste G= 17,79; p<0,001**).

TABELA 21 - COMPARAÇÕES ENTRE OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS COM OUTRAS AMOSTRAS JÁ DESCRITAS

	Oliveira, 2009 n (%)	Kreike <i>et al.</i> , 2007 n (%)	Bidard <i>et al.</i> , 2007 n (%)	Dent <i>et al.</i> , 2007 n (%)	Qui-quadrado
Triplo -	17 (14,41)	-	150 (18,23)	180 (11,24)	$\chi^2_2 = 22,55; p < 0,001$
Não triplo -	101 (85,59)	-	673 (81,77)	1421 (88,76)	
Idade					
≤ 50 anos	6 (35,29)	57 (58,76)	56 (39,16)	-	$\chi^2_2 = 9,82; p < 0,01$
> 50 anos	11 (64,71)	40 (41,24)	87 (60,84)		
Envolvimento de linfonodos					
Positivo	8 (47,06)	43 (44,33)	-	87 (55,41)	$\chi^2_2 = 3,06; p > 0,20$
Negativo	9 (52,94)	54 (55,67)		70 (44,59)	
Grau					
Grau I	2 (11,76)	2 (2,15)	4 (2,80)	15 (9,80)	$\chi^2_6 = 35,64; p < 0,001$
Grau II	8 (47,06)	8 (8,60)	48 (33,57)	37 (24,18)	
Grau III	7 (41,18)	83 (89,25)	91 (63,63)	101 (66,02)	
Total	17	97	823	180	

FONTE: o autor (2009)

NOTA: n – número de pacientes; **Kreike *et al.*, 2007** - 97 tumores primários de mama triplo-negativos, congelados; **Bidard *et al.*, 2007** – 823 tumores mamários localizados e triplo-negativos, 95 do subtipo basal e 48 não basal; **Dent *et al.*, 2007** – 180 carcinomas de mama invasivos e triplo-negativos.

7. DISCUSSÃO

A carcinogênese mamária é caracterizada pela instabilidade genética (LENGAUER *et al.*, 1998 e WANG *et al.*, 2004), sendo que dois mecanismos importantes envolvidos neste processo são a perda de heterozigose (LOH) e ampliações gênicas (LASKO *et al.*, 1991). Regiões que apresentam LOH podem conter genes supressores de tumor, sendo que vários estudos já foram conduzidos envolvendo a análise de LOH no câncer de mama (MILLER *et al.*, 2003).

Estes se baseiam principalmente na hipótese dos “dois eventos” de Knudson, e têm como objetivo identificar genes supressores de tumor através do mapeamento de regiões cromossômicas com perdas alélicas. A metodologia utilizada possibilita a identificação de alterações na dosagem de um alelo de um marcador polimórfico heterozigoto em relação ao outro alelo.

Em cânceres esporádicos a inativação de genes supressores tumorais acontece freqüentemente através de mutações gênicas ou mecanismos epigenéticos e LOH (THIAGALINGAM *et al.*, 2002). Segundo YANG *et al.* (2002) a hipermetilação e a LOH são os dois principais mecanismos de perda de função de genes supressores de tumor em carcinomas mamários esporádicos, no entanto ainda não se sabe qual dos eventos ocorre primeiro durante a tumorigênese (THIAGALINGAM *et al.*, 2002).

A aplicação da LOH como marcador de prognóstico através da técnica de genotipagem em seqüenciador automático de DNA oferece vantagens por ser um método que possibilita a utilização de diferentes marcadores simultaneamente, podendo analisar um grande número de amostras em um único ensaio laboratorial (MATSUMOTO *et al.*, 2000).

A região 9p está envolvida em inversões cromossômicas, translocações, deleções e LOH em gliomas, tumores de pulmão, leucemias e melanomas. Deleções em marcadores microssatélites em 9p21 são encontradas em mais da metade dos melanomas. Estes resultados sugerem que a região 9p contém um ou mais genes supressores de tumor que devem estar envolvidos na gênese de diversos tipos de tumores (KAMB *et al.*, 1994; NOBORI *et al.*, 1994)

A análise detalhada desta região indicou que ela contém o gene *CDKN2A*, um inibidor de quinase dependente de ciclina (KAMB *et al.*, 1994). Estas moléculas

previnem a fosforilação da proteína RB pela inibição dos complexos CDK4/6-ciclina D, e assim a RB permanece ligada ao fator de transcrição E2F, retardando a transição G1/S (SHERR, 2000; 2001). Análises posteriores revelaram que o gene *CDKN2A* está freqüentemente deletado em linhagens celulares tumorais, inclusive em 60% dos carcinomas de mama (NOBORI *et al.*, 1994 e SPRUCK *et al.*, 1994), indicando-o como um supressor de tumor.

7.1 FREQUÊNCIAS DE LOH EM 9p

As frequências de LOH em cada um dos cinco marcadores analisados em nosso trabalho estão descritas na TABELA 4. A LOH em pelo menos um dos marcadores foi observada em 44 (24,86%) das 177 amostras informativas. Em cada loco foram observadas baixas frequências de perdas alélicas, consideradas baixas por serem inferiores a 20%. A maior frequência foi de 15,97% (19/119) para o marcador D9S1749.

As frequências de HO, HE, LOH e não LOH foram comparadas com as descritas em carcinomas bucais de células escamosas por PROPST (2007), do nosso grupo de pesquisa. As diferenças foram significativas somente para as frequências de HO ($\chi^2_4 = 12,60$; $p < 0,05$), sendo menores em todos os marcadores da amostra de carcinomas mamários que analisamos (TABELA 12).

As frequências de LOH em nossa amostra foram menores, embora estatisticamente não significativas, do que às observadas em todos os marcadores por PROPST (2007). Considerando este resultado, e para avaliar alguma interferência do procedimento metodológico, reanalisamos a ausência de LOH em 23 amostras (10%) heterozigotas para três marcadores (D9S171, D9S1748, D9S169), totalizando 69 repetições. Somente em um marcador de um único caso observou-se a presença de LOH nesta segunda análise, o que significou apenas 1,45% (1/69) de não concordância entre as duas análises. Este resultado indica que a menor frequência de LOH observada neste trabalho, quando comparada com os anteriores do nosso grupo de pesquisa, não é devido a problemas metodológicos.

Frequências elevadas de LOH em carcinomas bucais de células escamosas foram descritas por VAN DE RIET *et al.* (1994), GONZALEZ *et al.* (1995) e SHAHNAVAZ *et al.* (2001). No entanto, WEBER *et al.* (2003), observaram uma

frequência de LOH de 20%, próxima aos nossos resultados em câncer de mama e inferior aos resultados de PROPST (2007) em carcinomas bucais de células escamosas.

As frequências de LOH descritas neste trabalho em 9p também são inferiores às descritas por OLIVEIRA (2008), do nosso grupo de pesquisa, para o braço curto do cromossomo 3 na mesma amostra de carcinomas mamários. As altas frequências de LOH encontradas em todas as sub-regiões estudadas, semelhantes a outros estudos descritos na literatura, sugeriram a existência de genes supressores tumorais com função relevante na etiologia e progressão dos carcinomas de mama, como os genes *VHL* (*von Hippel-Lindau tumor suppressor*), *FANCD2* (*Fanconi anemia, complementation group D2*), *THRB* (*thyroid hormone receptor, beta*), *RARB* (*retinoic acid receptor, beta*), *RBM5* (*RNA binding motif protein 5*), *BAP1* (*BRCA1 associated protein-1*), *RASSF1* (*Ras association domain family member 1*), *FHIT* (*fragile histidine triad gene*) e *ROBO1* (*roundabout, axon guidance receptor, homolog 1*). Este resultado sugere uma maior relevância de 3p, principalmente nas regiões próximas aos genes acima citados, no desenvolvimento de carcinomas mamários, em relação à região próxima ao gene *CDKN2A*, em 9p21.3. Este resultado é semelhante ao descrito por MAO *et al.* (2005), em 21 tumores de mama esporádicos de uma amostra da população chinesa, em que analisaram 59 marcadores microssatélites distribuídos por todo o genoma. As frequências de LOH em dois dos três marcadores em 3p foram superiores às frequências de LOH no marcador em 9p (22% em D3S1597, 56% em D3S1578 e 0% em D9S274, respectivamente). MILLER *et al.* (2003) apresentaram dados semelhantes analisando 118 trabalhos publicados, demonstrando no conjunto perdas preferenciais em 7q, 16q, 13q, 17p, 8p, 21q, 3p (30%), 18q, 2q e 19p. A frequência de LOH em 9p foi de aproximadamente 20%.

A TABELA 13 apresenta as comparações entre as frequências de LOH em 9p descritas em nosso trabalho com outros da literatura, com tumores mamários. As análises foram divididas pelo subtipo histológico das amostras. Na comparação dos resultados de todos os subtipos observados no nosso trabalho e o de GORGOULIS *et al.* (1998), as diferenças não foram estatisticamente significativas ($\chi^2_{1} = 0,03$; $p > 0,80$). Na comparação entre as frequências de LOH nos subtipos lobulares de nosso trabalho e das descritas por HUIPING *et al.* (1999) também não foram encontradas diferenças significativas (Teste Exato de Fisher = $p > 0,99$). Entretanto,

foram encontradas diferenças significativas nas frequências de LOH em 9p em relação às descritas por AN *et al.*(1999), em carcinomas mamários de vários subtipos (42,65%), HUIPING *et al.* (1999), em carcinomas ductais (44,78%) e FUJII *et al.* (2002), em carcinomas mucinosos (11,76%).

Em nosso trabalho apenas duas amostras são de carcinomas mucinosos, sendo uma não informativa em todos os locos analisados e a outra não informativa em um loco e com retenção da heterozigose nos outros, não sendo possível fazer comparações com outros trabalhos. FUJII *et al.* (2002), analisando 18 carcinomas mucinosos, observaram que as maiores frequências de LOH ocorreram em 11q (44%). Estes autores também compararam as frequências de LOH em 9p em carcinomas mucinosos, CDI e CDIS, sendo que as maiores foram nos tumores invasores (~50%) e *in situ* (~30%) em relação aos mucinosos, com diferenças estatisticamente significativas (**p<0,001**). Comparando os resultados de FUJII *et al.* (2002) com os descritos por outros autores (GORGOULIS *et al.*, 1998; AN *et al.*, 1999; HUIPING *et al.*, 1999), observa-se que a frequência de LOH em 9p nos carcinomas mucinosos é menor do que a encontrada em outros subtipos. Estes dados estão de acordo com as considerações de FUJII *et al.*(2002), que sugerem que este tipo de tumor apresenta uma patogênese molecular diferente de outros tipos de cânceres de mama.

GORGOULIS *et al.* (1998) analisaram LOH com 4 marcadores microsatélites de 9p21-p22 em 55 amostras microdissectadas de carcinomas mamários, sendo 48 carcinomas ductais, 4 lobulares e 3 carcinomas mistos invasores. Nenhuma das pacientes tinha historia familiar de câncer de mama. Todas as análises foram feitas em gel de poliacrilamida 10% e corados com prata. Embora o sistema de detecção dos produtos de PCR utilizado em nosso trabalho seja mais preciso que o utilizado por GORGOULIS *et al.*, as frequências de LOH foram semelhantes (11,4 e 8,89%, respectivamente; Teste exato de Fisher= p>0,70) para o marcador D9S171, utilizado em comum em ambos os trabalhos.

A frequência de LOH em D9S171 também não diferiu significativamente da descrita por SCHWARZENBACH *et al.* (2007), em 42 pacientes com carcinomas mamários primários e metastáticos ($\chi^2_1= 0,79$; p>0,30), sendo que neste trabalho o sistema de detecção utilizado foi semelhante ao nosso. O mesmo ocorreu em relação ao trabalho de ELLSWORTH *et al.* (2005), com 24 tumores de mama com metástases axilares (Teste exato de Fisher: p>0,98) (TABELA 14). Já em relação a

outros trabalhos, a frequência de LOH neste marcador foi menor (BRENNER e ALDAZ, 1995 e SMEDS *et al.*, 2005).

No trabalho de BRENNER e ALDAZ (1995), a região 9p foi analisada quanto a LOH em 24 amostras de carcinomas mamários, utilizando 5 marcadores microssatélites polimórficos. Foi observada LOH em 14 tumores (58%), e em 12 deles foi observada LOH em múltiplos marcadores. A maioria das perdas ocorreu nos marcadores D9S169 e D9S171, que apresentaram frequências de LOH de 58% e 53% respectivamente. Embora, em geral, os autores tenham descrito altas taxas de perdas alélicas, não observaram frequências elevadas de mutações em ponto após a análise de PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction – Single Strand Conformation Polymorphism*) e sequenciamento do DNA, sugerindo que mutações neste gene não são um evento crítico na carcinogênese mamária, e que no gene *CDKN2A* provavelmente as perdas alélicas não são frequentes. BRENNER e ALDAZ (1995) sugerem que a frequência das mutações no gene *CDKN2A* possa ser maior do que as observadas, já que algumas ocorrem fora da região codificante, ou ainda a hipermetilação deste gene pode afetar sua expressão. A detecção de mutações também pode ser dificultada pela presença de DNA de células normais, encontradas com as malignas em tumores mamários. Os autores também sugerem que em 9p21 possa haver outro gene supressor de tumor com relevância no câncer de mama, baseados em resultados similares (CAIRNS *et al.*, 1994) de discrepâncias em tumores primários de outros tecidos.

ELLSWORTH *et al.* (2005) utilizaram um painel de 52 marcadores microssatélites previamente descrito por ELLSWORTH *et al.* (2003), para avaliar LOH em amostras pareadas de tumores primários de mama e metástases em linfonodos axilares. A frequência de LOH no marcador D9S171 nos tumores primários foi de 12,5%, e nas metástases axilares foi de 8% (TABELA 14), semelhantes aos nossos resultados. O método de genotipagem utilizado em nosso trabalho e no de ELLSWORTH *et al.* (2005) foi semelhante (amplificação dos marcadores por PCR com iniciadores fluorescentes, genotipagem em seqüenciador capilar de DNA *Megabace 1000* e determinação dos genótipos utilizando softwares específicos), podendo-se excluir variações das frequências de LOH entre os trabalhos devido a diferenças metodológicas, como o observado em relação ao trabalho de BRENNER e ALDAZ (1995), cujas genotipagens foram feitas através da amplificação dos marcadores por PCR e eletroforese em gel de agarose 2-3%.

ARGOS *et al.* (2008) examinaram a presença de LOH e alterações no número de cópias de DNA em 16 tumores mamários invasores microdissectados, utilizando a plataforma de microarranjo *Affymetrix 10K Mapping SNP array*, que contém 11.500 SNPs (Single Nucleotide *Polymorphism*). Entre os resultados obtidos, os autores observaram que as regiões 2p25.3, 2p21, 2p15~p16.1, 2q23.3, e 16q12.1 apresentavam frequências de LOH significativas para sugerir seu envolvimento com a carcinogênese mamária. A região 9p não apresentou frequências de LOH relevantes.

HUIPING *et al.* (1999), estudando as frequências de LOH em diversas regiões cromossômicas em tumores lobulares e ductais, encontraram uma associação significativa entre os tumores ductais e LOH em 1p, 3p, 9p, 11q, 13q e 18q. Em 9p, foram utilizados cinco marcadores, sendo um em 9p21.3 (D9S171), e as frequências de LOH nos tumores lobulares e ductais foram de 17% e 45%, respectivamente (**p<0,01**). Em nosso trabalho, não foram observadas diferenças na frequência de LOH em 9p21 nos dois subtipos histológicos (Teste Exato de Fischer: p=1,0), sendo que as frequências de LOH nos carcinomas lobulares e ductais foram de 26,49% e 22,22%, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de LOH em 9p nos tumores lobulares no nosso trabalho e no de HUIPING *et al.* (1999) (Teste Exato de Fischer: p>0,99). Quanto aos carcinomas ductais, as frequências de LOH observadas por HUIPING *et al.* foram significativamente maiores ($\chi^2_1 = 10,42$; **p<0,01**). A metodologia de análise dos microssatélites utilizada no trabalho de HUIPING *et al.* foi a autoradiografia, que como já foi mencionado anteriormente, é uma técnica com uma sensibilidade técnica menor que a genotipagem em seqüenciador de DNA.

CALVANO *et al.* (1997) não observaram deleções ou mutações de ponto no gene *CDKN2A* em carcinomas primários de mama, sugerindo que este gene não exerce um papel relevante na carcinogênese mamária se avaliado pela ocorrência destes dois mecanismos, assim como em nosso trabalho. XU *et al.* (1994) também não encontraram mutações no gene *CDKN2A* em um estudo com 37 carcinomas primários de mama e 5 linhagens tumorais de células mamárias. Entretanto, a inativação do gene por silenciamento epigenético já foi descrita por diversos autores em tumores mamários (HERMANN *et al.*, 1995; FOSTER *et al.*, 1998; DOMINGUEZ *et al.*, 2003; NAQVI *et al.*, 2008). LIGGETT e SIDRANSKY (1998) afirmaram que o *CDKN2A* é um gene supressor de tumor devido às taxas elevadas de mutações,

deleções ou hipermetilação no promotor em uma variedade de tumores. Em uma revisão, verificaram que a inativação por mutações é frequentemente observada em carcinomas de esôfago e pâncreas. Deleções homozigotas neste gene são eventos comuns em carcinomas de bexiga, mesoteliomas, gliomas de alto grau, carcinomas de cabeça e pescoço e cânceres hematológicos, e a metilação aberrante da região promotora é vista como uma forma de silenciamento do *CDKN2A* em carcinomas de cólon e neoplasias mamárias.

Conforme os resultados de nosso trabalho e outros da literatura, a LOH em 9p, onde está localizado o gene *CDKN2A*, não foi correlacionada com o desenvolvimento da carcinogênese mamária. Deve-se levar em conta a distribuição dos marcadores no cromossomo, em uma ampla região de aproximadamente 16 milhões de pares de bases, sendo que o marcador mais próximo ao gene *CDKN2A* é o D9S1748 (distante aproximadamente 18 mil pares de bases). Para uma análise mais específica sobre a inativação desta região cromossômica, e principalmente do gene *CDKN2A*, no câncer de mama, é recomendada a utilização de marcadores mais próximos ao gene em questão, e inclusive intragênicos. Ainda, pode haver outros mecanismos mais relevantes para esta inativação, como a hipermetilação da região promotora do gene.

7.1.1 Frequências de LOH em 9p e os parâmetros clínicos

Neste trabalho não foram encontradas associações entre a ocorrência de LOH em 9p e os parâmetros clínicos (tempo entre menarca e menopausa, uso de contraceptivos hormonais, idade da primeira gravidez e hábito tabagista). Portanto, fatores de risco conhecidos para o câncer de mama, como maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno, exposição ao estrogênio exógeno, idade avançada da primeira gravidez e exposição aos efeitos carcinogênicos do tabaco não estão relacionados a um aumento da instabilidade genética em 9p.

Não foi possível fazer comparações entre estes resultados e outros da literatura, devido à escassez de informações clínicas das pacientes em outras pesquisas.

7.1.2 Frequências de LOH em 9p e os parâmetros histopatológicos

Neste trabalho, não foram observadas associações entre as frequências de LOH em 9p e os parâmetros histopatológicos (metástases axilares, grau histológico, tamanho do tumor, receptores hormonais e amplificação do *HER2*), indicando que a ocorrência de instabilidade genética nesta região não está associada ao desenvolvimento e progressão da doença.

Apenas em relação ao marcador D9S200 (9p13.1), a média dos tamanhos dos tumores de pacientes com LOH ($44,53 \pm 12,54$ mm) foi superior a média dos tamanhos de pacientes sem LOH ($32,13 \pm 17,58$ mm) (TABELA 08). Mais informações são necessárias para a obtenção de resultados mais consistentes sobre a associação entre LOH em 9p13.1 e os parâmetros histopatológicos, principalmente direcionando as pesquisas para uma análise com mais marcadores nesta região, utilizando amostras mais homogêneas (por exemplo, com carcinomas mamários de apenas um subtipo), ou analisando outras formas de inativação dos genes. Além disso, tumores grandes tendem a apresentar um maior número de alterações genéticas, como perdas alélicas, do que tumores pequenos, devido ao maior tempo de progressão da doença.

AN *et al.* (1996) não encontraram associação entre a LOH em 9p21-p22 e os parâmetros histopatológicos analisados. GORGOLIS *et al.* (1998), como em nosso trabalho, não encontraram associações entre as frequências de LOH em 9p21-p22 e os parâmetros histopatológicos, tamanho do tumor (<2,0cm; 2,0cm e >2,0cm), presença de metástases axilares, grau histológico (I, II e III), RE e RP (p>0,10; p>0,80; p>0,90; p>0,90 e p>0,90; respectivamente).

Em nosso trabalho, a frequência de LOH no marcador D9S171 e em todos os marcadores em conjunto não diferiu significativamente em relação aos graus histológicos dos tumores ($\chi^2_2 = 0,54$; p>0,70 e $\chi^2_2 = 2,71$; p>0,20, respectivamente). Este resultado não está de acordo com o obtido por ELLSWORTH *et al.* (2005) em relação aos tumores invasivos, em que a frequência de LOH em D9S171 não variou significativamente em relação ao grau histológico destes tumores (grau I: 3 em 12 pacientes informativas, grau II: 11 em 69 e grau III: 2 em 41; teste G= 3,76, p>0,1), porém em relação a LOH em todos os marcadores, houve diferenças significativas

conforme o grau ($\chi^2= 7,04$; $p<0,05$), sendo que a frequência de LOH foi menor nos tumores de grau histológico maior (grau I: 40%; grau II: 30%; grau III 12,77%).

ELLSWORTH *et al.*, 2007 e 2008, encontraram diferenças significativas nas frequências de LOH em 9p21 em CDIS e CDI conforme o grau histológico. No primeiro, não encontraram alterações neste loco em CDIS de grau I, e as frequências em tumores de graus II e III foram de 7% e 30%, respectivamente (**p_{g1} vs. $g3= 0,0131$** ; p_{g1} vs. $g2= 0,5264$; **$p_{g1/2}$ vs. $g3= 0,0034$**). No segundo, encontraram diferenças significativas nas frequências de LOH neste loco em CDI de grau I em relação a de graus II e III, sendo respectivamente 2%, 23% e 21% (**p_{g1} vs. $g3= 0,0044$** ; **p_{g1} vs. $g2= 0,0018$** ; p_{g2} vs. $g3= 0,8258$). Eles sugerem que alterações em 9p21, 13q14 e 17p13.1, juntamente com 6q25-q27 e 8q24 em CDIS, e 11q23, 17q21 em CDI, estão associadas com o desenvolvimento de tumores pouco diferenciados e de alto grau histológico.

SMEDS *et al.* (2005) não encontraram diferenças significativas entre as frequências de LOH em 9p em CDIS de graus I e III. As frequências foram significativamente maiores em 11q e 16q em tumores de grau I (**$p=0,009$ e $p=0,005$** , respectivamente). A frequência de LOH no marcador D9S171, em 30 carcinomas ductais *in situ*, foi de 50% para os tumores de grau I e 15% para os tumores de grau III. Este resultado é semelhante ao observado em nosso trabalho em relação aos tumores invasivos, sendo que a frequência de LOH diminuiu conforme o aumento do grau histológico (25% nos tumores de grau I, 16% nos de grau II e 5% nos de grau III), porém as diferenças não foram estatisticamente significativas nos dois trabalhos, provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral de cada subgrupo (teste G= 3,76, $p>0,1$ para o nosso trabalho e Teste Exato de Fisher: $p>0,20$ para o trabalho de SMEDS *et al.*). A mesma análise não pode ser feita no nosso trabalho em relação aos CDIS, devido ao pequeno tamanho amostral ($n=4$). SMEDS *et al.* também não encontraram diferenças significativas quanto a frequência de LOH em 9p em CDIS com e sem recorrência da doença ($p>0,50$).

MARSH *et al.* (1998), analisando carcinomas mamários, observaram frequências de LOH em 9p significativamente maiores nos carcinomas ductais *in situ* em relação aos tumores invasivos.

SCHWARZENBACH *et al.* (2007) analisaram a frequência de LOH em sete marcadores microssatélites, incluindo o marcador D9S171, em amostras de tumor primário, sangue periférico e medula óssea de 40 pacientes com câncer de mama

não metastático e 48 pacientes com doença metastática. Encontraram associação entre a LOH no marcador D9S171 e tumores de alto grau nuclear, sugerindo que o gene *CDKN2A* possa estar envolvido na patogênese do câncer de mama esporádico. Este resultado não está de acordo com o observado em nosso trabalho, em que as frequências de LOH em D9S171 e em todos os marcadores em conjunto se distribuíram homoganeamente quanto ao grau histológico dos tumores (TABELA 09). A frequência de LOH neste marcador já havia sido previamente associada com o câncer gástrico (ZHANG *et al.*, 2003). A frequência de LOH em D9S171 também foi maior em pacientes com câncer de mama sem metástases à distância (~15%) em relação às pacientes com metástases (~5%), e foi significativamente associada com a expressão do antígeno marcador de proliferação celular Ki-67.

No trabalho de HUIPING *et al.* (1999) com carcinomas lobulares, foi encontrada uma associação significativa entre a LOH em 9p e baixo conteúdo de RE e RP ($p=0,001$). Os autores sugerem que a LOH em 9p possa estar associada com a perda dos RE e RP, o que não foi corroborado em nosso trabalho.

7.2 FREQUÊNCIAS DE IM EM 9p

As frequências de IM encontradas em nosso trabalho para cada um dos cinco marcadores analisados estão descritas na TABELA 04. A IM em pelo menos um dos marcadores foi observada em 15 (8,47%) das 177 amostras informativas. Em todos os locos foram encontradas baixas frequências de IM, não havendo diferenças significativas entre os marcadores. A maior frequência foi de 3,68% (5/136) para o marcador D9S169.

Estas frequências são semelhantes aos resultados obtidos por OLIVEIRA (2008), do nosso grupo de pesquisa, para a região cromossômica 3p na mesma amostra de carcinomas mamários, que também encontrou baixas frequências de IM em todos os marcadores analisados.

As IM foram associadas com a carcinogênese pela primeira vez em pacientes com câncer de cólon, com uma frequência de 28% (THIBODEAU *et al.*, 1993). Em pacientes com HNPCC (síndrome de câncer colorretal hereditária sem polipose) foram descritas até 70% de IM (AALTONEN *et al.*, 1993). A presença de IM embora em frequências menores, também tem sido associada a outros tipos de

cânceres, como gástrico, endometrial, pulmão, bexiga e mama (RUSH *et al.*, 1997; MAITRA *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2007).

A presença IM em cânceres de mama ainda não está bem definida na literatura. Alguns trabalhos descrevem o envolvimento da IM em carcinomas mamários, como os de YEE *et al.* (1994) que encontraram freqüência de 20% para marcadores localizados nos cromossomos 15, 18 e X e de RUSH *et al.* (1997) que observaram freqüência de 28,2% para marcadores no cromossomo 17. No entanto, ANBAZHAGAN *et al.* (1999) analisando 267 tumores de mama invasores, e um total de 104 marcadores localizados em 11 cromossomos (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 16 e 17), não encontraram nenhum caso de instabilidade de microssatélite.

As baixas freqüências de IM encontradas em nosso trabalho e outros da literatura mostram que embora as instabilidades de microssatélites estejam presentes em tumores mamários, não se pode afirmar que elas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama, sendo que para tal discussão seria necessária a análise de um número maior de marcadores distribuídos por outros locos no genoma. É provável que as mudanças observadas em microssatélites sejam somente marcadores da instabilidade genômica e consequência dos erros de pareamento dos cromossomos.

7.3 ANÁLISES ENTRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa em relação aos subtipos histológicos quanto à freqüência de positividade do RE (TABELA 15), sendo que todos os carcinomas lobulares da amostra eram positivos para o RE. MOHSIN *et al.* (2005), em um trabalho com CLIS, encontraram uma freqüência de 98% de tumores positivos para o RE. A literatura mostra que o perfil molecular dos CLI, embora não seja exclusivo dos carcinomas lobulares, é distinto dos outros tipos de tumores, por serem em geral negativos para amplificação do *HER2*, positivos para RE e RP, e, portanto, de bom prognóstico (ARPINO *et al.*, 2004). Nossos resultados para os CL também se aproximam dos descritos por MOHSIN *et al.* (2005) quanto a freqüência de positividade para o RP (84%) e amplificação do *HER2* (4%).

Em relação à presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares, a média dos tamanhos dos tumores foi maior em pacientes com metástases do que nas sem metástases nestes linfonodos (TABELA 16). Ao diagnóstico, pacientes com metástases ($54,86 \pm 12,89$ anos) apresentaram média de idade significativamente menor do que as sem metástases ($58,04 \pm 13,98$ anos) ($t= 6,42$; $p<0,001$). Outra diferença significativa foi em relação ao grau histopatológico, sendo que 36,67% das pacientes com tumores com metástases em linfonodos axilares e 23,91% das pacientes com tumores sem metástases em linfonodos axilares eram de grau III ($\chi^2_2= 9,34$; $p<0,001$). Estes dados demonstram a importância da detecção de metástases em linfonodos axilares (e atualmente, da técnica de biópsia do linfonodo sentinela como um marcador de metástases axilares) e a relevância desta como um fator prognóstico no câncer de mama. De acordo SILVA, ROCHA e BARINI (2006), a presença de metástases nos linfonodos axilares é, atualmente, o fator de mau prognóstico mais importante para pacientes com câncer de mama, indicando que o tumor é capaz de gerar metástases à distância.

ELLSWORTH *et al.* (2007), em uma amostra de 100 CDIS, encontraram diferença significativa quanto a expressão do *HER2* em relação ao grau dos tumores, sendo que 7% dos tumores de grau I foram *HER2+*, 38% dos de grau II e 74% dos de grau III. Esta associação não foi observada em nosso trabalho ($\chi^2_2= 2,49$; $p>0,20$) para os carcinomas de todos os subtipos (frequência de *HER2+* de 25, 30 e 42% para tumores de graus I, II e III, respectivamente).

Em um trabalho subsequente (ELLSWORTH *et al.*, 2008) analisando 185 carcinomas invasivos de vários subtipos, encontraram diferenças significativas quanto ao status da menopausa, dos receptores hormonais e amplificação do *HER2* em relação ao grau histológico. Pacientes com tumores de grau I apresentaram frequência de pós-menopausa superior a pacientes com tumores de grau III, indicando que pacientes com tumores mais agressivos apresentaram média de idade inferior, o que não foi observado em nosso trabalho, já que não foram observadas diferenças entre as médias de idade das pacientes conforme o grau histológico nos tumores de todos os subtipos (TABELA 19). Em relação aos receptores hormonais, ELLSWORTH *et al.* (2008) observaram frequências elevadas de positividade para os RE e RP em tumores de grau I e II em comparação a tumores de grau III, sendo que o mesmo foi observado em nosso trabalho com tumores de todos os subtipos (85%; 79%; 47,5% e 90%; 74%; 47,5% para RE e RP

e tumores de graus I, II e III, respectivamente). Quanto a amplificação do *HER2*, ELLSWORTH *et al.* (2008) encontraram frequências elevadas de positividade em tumores de grau III, o que não foi observado nos nossos resultados por apresentarem uma distribuição homogênea de tumores *HER2+* e *HER2-* quanto ao grau histológico dos mesmos ($\chi^2_2= 3,34$; $p>0,10$).

Na comparação dos dados histopatológicos com outras amostras já descritas (TABELA 20), foram encontradas diferenças significativas quanto ao envolvimento de linfonodos, RE, RP e amplificação do *HER2*.

Quanto ao envolvimento de linfonodos axilares, nossos dados foram comparados com os de ARUN *et al.* (2005), em uma amostra de 80 tumores primários de pacientes do estado do Texas (EUA). A frequência de metástases em linfonodos axilares foi significativamente maior em nosso trabalho ($\chi^2_1= 8,91$; $p<0,01$). Esse resultado sugere que no Brasil o diagnóstico do câncer de mama é tardio em comparação a outros países, o que implica um pior prognóstico da doença e, conseqüentemente, maior taxa de recorrência e mortalidade.

As frequências dos receptores hormonais e amplificação do *HER2* foram comparadas com as descritas por ARUN *et al.* (2005) (com exceção do *HER2*), por DENT *et al.* (2007), por KIM *et al.* (2007) e por ARGOS *et al.* (2008), sendo os três últimos somente com tumores invasivos. Quanto ao RE, os resultados observados em nosso trabalho não diferiram significativamente dos descritos por ARUN *et al.* e ARGOS *et al.* (2008). A frequência de positividade para o RE foi inferior a descrita por DENT *et al.* (2007) ($\chi^2_1= 29,26$; $p<0,001$), em tumores invasivos de vários subtipos, e superior a descrita por KIM *et al.* (2007) ($\chi^2_1= 11,40$; $p<0,001$), em uma amostra de CDI. Quanto ao RP, os resultados observados não diferiram significativamente dos descritos por DENT *et al.* (2007) e ARGOS *et al.* (2008). Entretanto, a frequência de positividade para o RP foi superior a observada por ARUN *et al.* (2005) ($\chi^2_1= 7,00$; $p<0,01$), em uma amostra semelhante a nossa, e por KIM *et al.* (2007) ($\chi^2_1= 7,70$; $p<0,01$), com CDI. Quanto a amplificação do *HER2*, os resultados observados não diferiram significativamente dos descritos por KIM *et al.* (2007) e por ARGOS *et al.* (2008). A frequência de amplificação do *HER2* foi superior a observada por DENT *et al.* (2007) ($\chi^2_1= 24,10$; $p<0,001$). Estas variações nas frequências dos receptores hormonais e de amplificação do *HER2* entre os trabalhos citados podem ser explicadas por variações no tamanho amostral, nos

subtipos histológicos de cada amostra, e inclusive pela metodologia utilizada por cada grupo de pesquisa para a análise destes parâmetros.

Na comparação dos dados histopatológicos dos tumores triplo-negativos deste trabalho com outros já descritos (TABELA 21), foi encontrada diferença significativa quanto ao grau histológico. As frequências dos graus histológicos dos tumores triplo-negativos foram comparadas com as descritas por BIDARD *et al.* (2007), em tumores *in situ*, por DENT *et al.* (2007), em tumores invasivos e por KREIKE *et al.* (2007), em tumores de vários subtipos. As frequências dos graus dos tumores das pacientes da nossa amostra não se distribuíram homoganeamente em relação às apresentadas por KREIKE *et al.* (2007) (**Teste G= 17,79; p<0,001**), sendo que neste a frequência de tumores grau III foi significativamente maior. É importante ressaltar as diferenças do tamanho das amostras, sendo a nossa de tumores triplo-negativos menor do que as analisadas pelos outros autores citados.

8. CONCLUSÕES

Conforme os resultados de nosso trabalho e outros da literatura, onde foram observadas baixas frequências de LOH (abaixo de 20%) em todos os marcadores analisados, sugerimos que a LOH não é o principal mecanismo utilizado para a inativação destas regiões no câncer de mama. Outros mecanismos, como a hipermetilação, parecem apresentar maior relevância.

Neste trabalho também não foram observadas associações entre as frequências de LOH em 9p e os parâmetros histopatológicos da amostra, indicando que a ocorrência de instabilidade genética nesta região não está associada ao desenvolvimento da doença. Apenas em relação ao marcador D9S200, a média dos tamanhos dos tumores de pacientes com LOH foi superior à média dos tamanhos dos tumores de pacientes sem LOH, sugerindo que a região 9p13.1 possa estar envolvida com a progressão dos tumores mamários. Entretanto, tumores grandes, devido ao maior tempo de progressão da doença, tendem a apresentar mais alterações genéticas, como perdas alélicas, em relação aos tumores pequenos, o que pode explicar o resultado obtido. Mais estudos devem ser feitos para testar estas hipóteses, com mais marcadores, utilizando uma amostra mais homogênea, ou analisando outras formas de inativação de genes nesta região.

As baixas frequências de IM encontradas em nosso trabalho sugerem que embora as instabilidades de microssatélites estejam presentes em tumores mamários, elas não são relevantes para o desenvolvimento do câncer de mama.

Os resultados das análises dos parâmetros histopatológicos mostram todos os carcinomas lobulares da amostra positivos para o RE, o que está de acordo com outros resultados da literatura.

Os dados de tamanho do tumor e idade de acometimento da doença em relação à presença de metástases em linfonodos axilares demonstraram a importância da detecção de metástases em linfonodos axilares (e atualmente, da técnica de biópsia do linfonodo sentinela como um marcador de metástases axilares) e a relevância desta como um fator prognóstico no câncer de mama.

Na comparação com outros trabalhos da literatura, o resultado sobre o envolvimento de linfonodos axilares indica que no Brasil o diagnóstico do câncer de

mama ainda é tardio, o que implica um pior prognóstico da doença e, conseqüentemente, maior taxa de recorrência e mortalidade.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, L.A.; PELTOMÄKI, P.; LEACH, F.S.; SISTONEN, P.; PYLKKÄNEN, L.; MECKLIN, J.P.; JÄRVINEN, H.; POWELL, S.M.; JEN, J.; HAMILTON, S.R. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**. Vol. 260, p. 812-6, 1993.

AGNARSSON, B.A.; JONASSON, J.G.; BJORNSDOTTIR, I.B.; BARKARDOTTIR, R.B.; EGILSSON, V.; SIGURDSSON, H. Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. Vol. 47, p. 121–127, 1998.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_is_breast_cancer_5.asp>. Acesso em 12/12/2008.

AMUNDADOTTIR, L.T.; THORVALDSSON, S.; GUDBJARTSSON, D.F.; SULEM, P.; GULCHER, J.R.; BJORSSON, J.; KONG, A.; THORSTEINSDOTTIR, U.; STEFANSSON, K. Cancer as a complex phenotype: pattern of cancer distribution within and beyond the nuclear family. **PLoS Med**. Vol. 1, n^o 3, p. 65, 2004.

ANBAZHAGAN, R.; FUJII, H. GABRIELSON, E. Microsatellite Instability Is Uncommon in Breast Cancer, **Clinical Cancer Research**. Vol. 5, p. 839- 844, 1999.

AN, H. X.; NIEDERACHER, D.; PICARD, F.; VAN ROEYEN, C.; BENDER, H. G.; BECKMANN, M. W. Frequent allele loss on 9p21–22 defines a smallest common region in the vicinity of the *CDKN2* gene in sporadic breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer**. Vol. 17, p. 14–20, 1996.

AN, H.X.; CLAAS A.; SAVELYEVA, L.; SEITZ, S.; SCHLAG, P.; SCHERNECK S.; SCHWAB, M. Two Regions of Deletion in 9p23-24 in Sporadic Breast Cancer. **Cancer Research**. Vol. 59, p. 3941-3943, 1999.

ANTONIOU, A.C.; PHAROAH, P.D.P.; McMULLAN, G.; DAY, N.E.; STRATTON, M.R.; PETO, J.; PONDER, B.J.; EASTON, D.F. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. **Br J Cancer**. Vol. 86, p. 76–83, 2002.

ARGOS, M.; KIBRIYA, M.G.; JASMINE, F.; OLOPADE, O.I.; SU, T.; HIBSHOOSH, H.; AHSAN, H. Genomewide scan for loss of heterozygosity and chromosomal amplification in breast carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. Vol. 182, p. 69 – 74, 2008.

ARPINO, G.; BARDOU, V.J.; CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**. Vol. 6, p. 149–156, 2004.

ARUN,B.; KILIC,G.; YEN, C.; FOSTER,B.; YARDLEY, D.A.; GAYNOR, R.; ASHFAQ, R. Loss of FHIT Expression in Breast Cancer Is Correlated with Poor Prognostic Markers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. Vol. 14, p. 1681 – 1685, 2005.

BARROS, A.C.S.D.; BARBOSA, E.M.; GEBRIM, L.H.; ANELLI, A.; FIGUEIRA FILHO, A.; DEL GIGLIO A.; GUSMÃO, C.B.; PELIZON, C.; MARTELLA, E.; MOTTA, E.; FERNANDES, J.L.; PINOTTI, J.A.; RIBEIRO, L.C.B.; SANTOS, M.O.; ARAÚJO, M.B.; ABREU e LIMA, M.C.; MOURÃO NETO, M.; YAMAGUCHI, N.H.; CARMO, P.A.O.; MARQUE, R. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Sociedade Brasileira de Mastologia, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Patologia, Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2001.

BATEMAN, A.C. Pathology of the Breast. **Basic Science**. P. 3-7, 2004.

BECKMANN, M.W.; NIEDERACHER, D.; SCHNURCH, H-G.; GUSTERSON, B.A.; BENDER, H.G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J Mol Med**. Vol. 75, p. 429–439, 1997.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1988.

BERAL, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**. Vol. 362, p. 419-427, 2003.

BIDARD, F.C.; CONFORTI, R.; BOULET, T.; MICHIELS, S.; DELALOGUE, S.; ANDRÉ, F. Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 “triple-negative” breast cancers. **Ann Oncol**. Vol. 7, p. 1285 – 1286, 2007.

BIGLIA, N.; DEFABIANI, E.; PONZONE, R.; MARIANI, L.; MARENCO, D.; SISMONDI, P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. **Endocr Relat Cancer**. Vol. 11, p. 69–83, 2004.

BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific

oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. HLA Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. **EDK**, 1997.

BLOOM, H.J.; RICHARDSON, W.W. Histologic Grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br J Cancer**. Vol. 11, p. 3593-3677, 1957.

BOYD, N.F.; DITE, G.S.; STONE, J.; GUNASEKARA, A.; ENGLISH, D.R.; McCREDIE, M.R.; GILES, G.G.; TRITCHLER, D.; CHIARELLI, A.; YAFFE, M.J.; HOPPER, J.L. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. **N Engl J Med**. Vol. 347, p. 886–894, 2002.

BRAY, F.; McCARRON, P.; PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer and mortality. **Breast Cancer Research**. Vol. 6, p. 229-239, 2004.

BRENNER, A. J.; ALDAZ, C. M. Chromosome 9p allelic loss and *p16/CDKN2* in breast cancer and evidence of *p16* inactivation in immortal breast epithelial cells. **Cancer Res**. Vol. 55, p. 2892–2895, 1995.

BUCHYNSKA, L.G.; NESINA, I.P.; YURCHENKO, N.P.; BILYK, O.O.; GRINKEVYCH, V.N.; SVINTITSKY, V.S. Expression of p53, p21WAF1/CIP1, p16INK4A and Ki-67 proteins in serous ovarian tumours. **Exp Oncol**. Vol. 29, n^o 1, p. 49-53, 2007.

BYRNE, C.; SCHAIRER, C.; BRINTON, L.A.; WOLFE, J.; PAREKH, N.; SALANE, M.; CARTER, C.; HOOVER, R. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**. Vol. 12, p. 103–110, 2001.

CAIRNS, P.; MAO, L.; MERLO, A.; LEE, D.J.; SCHWAB, D.; EBY, Y.; TOKINO, K.; VAN DER RIET, P.; BLAUGRUND, J.E.; SIDRANSKY, D. Rates of *p16 (MTS1)* mutations in primary tumors with 9p loss. **Science**. Vol. 265, p. 415–417, 1994.

CALVANO, J.E.; RUSH, E.B.; TAN, L.K.; ROSEN, P.P.; BORGAN, P.I.; VAN ZEE, K.J. Absence of p16 gene (CDKN2) deletions in microdissected primary breast carcinoma specimens. **Ann. Surg. Oncol**. Vol. 4, p. 416–420, 1997.

CAVALIERI, E.; FRENKEL, K.; LIEHR, J.G.; ROGAN, E.; ROY, D. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. **J Natl Cancer Inst Monogr**. P. 75–93, 2000.

CERILLI, L.A.; SWARTZBAUGH, J.R.; SAADUT, R.; MARSHALL, C.E.; RUMPEL, C.A.; MOSKALUK, C.A.; FRIERSON, H.F. Analysis of Chromosome 9p21 Deletion and p16 Gene Mutation in Salivary Gland Carcinomas. **Human Pathology**. Vol. 30, n° 10, p. 1242-1246, 1999.

CHABNER, B.A.; MURPHY, M.J.Jr. Breast cancer: a tale of two centuries: with implications for understanding cancer metastasis and cancer stem cell biology. **Oncologist**. Vol. 10, n° 6, p. 369; 2005.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D.N.; DAVISON, L.J.; DEKA, R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol. 94, p. 1041–1046, 1997.

CHAPPUIS, P.O.; KAPUSTA, L.; BEGIN, L.R.; WONG, N.; BRUNET, J.S.; NAROD, S.A.; SLINGERLAND, J.; FOULKES, W.D. Germline BRCA1/2 mutations and p27 (Kip 1) protein levels independently predict outcome after breast cancer. **J Clin Oncol**. Vol. 18, n° 24, p. 4045-4052, 2000.

CIPOLLINI, G.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; ARETINI, P.; BONATTI, F.; BRUNETTI, I.; BRUNO, M.; LOMBARDI, G.; SCHITTULLI, F.; SENSI, E.; TANCREDI, M.; BEVILACQUA, G.; CALIGO, M.A. Genetic alterations in hereditary breast cancer. **Ann Oncol**. Vol. 15, p. 7 – 13, 2004.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **Lancet**. Vol. 347, p. 1713–1727, 1996.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER
FAMILIAL BREAST CANCER. Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58209 women with breast cancer and 101986 women without the disease. **Lancet**. Vol. 358, p. 1389–1399, 2001.

CONSENSO PARA O CONTROLE DO CÂNCER DE MAMA (Síntese do Documento) 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 11/07/2007.

DEBNIAK, T.; GORSKI, B.; HUZARSKI, T.; BYRSKI, T.; CYBULSKI, C.; MACKIEWICZ, A.; GOZDECKA-GRODECKA, S.; GRONWALD, J.; KOWALSKA, E.; HAUS, O.; GRZYBOWSKA, E.; STAWICKA, M.; SWIEC, M.; URBANSKI, K.; NIEPSUJ, S.; WASKO, B.; GOZDZ, S.; WANDZEL, P.; SZCZYLIK, C.; SURDYKA, D.; ROZMIAREK, A.; ZAMBRANO, O.; POSMYK, M.; NAROD, S.A.; LUBINSKI, J. A

common variant of *CDKN2A* (p16) predisposes to breast cancer. **J Med Genet.** Vol. 42, p. 763-765, 2007.

DENOIX, P.F. Bull. **Inst. Nat. Hyg.** Vol. 7, p. 743, 1952.

DENT, R.; TRUDEAUS, M.; PRITCHARD, K.I.; HANNA, W.M.; KAHN, H.K.; SAWKA, C.A.; LICKLEY, L.A.; RAWLINSON, E.; SUN, P.; NAROK, S.A. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. **Clin Cancer Res.** Vol. 13, p. 4429 - 4434, 2007.

DEVILEE, P.; CLETON-JANSEN, A.M.; CORNELISSE, C.J. Ever since Knudson. **Trends Genet.** Vol. 17, p. 569–73, 2001.

DIETMAIER, W.; RIEDLINGER, W.; KÖHLER, A.; WEGELE, P.; BEYSER, K.; SAGNER, G.; WARTBICHLER, R.; RÜSCHOFF, J. Detection of Microsatellite Instability (MSI) and Loss of Heterozygosity (LOH) in Colorectal Tumors by Fluorescence-based Multiplex Microsatellite PCR. **Biochemica.** N^o. 2, 1999.

DOMINGUEZ, G.; SILVA, J.; GARCIA, J.M.; SILVA, J.M.; RODRIGUEZ, R.; MUÑOZ, C.; CHACÓN, I.; SANCHEZ, R.; CARBALLIDO, J.; COLÁS, A.; ESPAÑA, P.; BONILLA, F. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. **Mutation Research.** Vol. 530, p. 9 – 17, 2003.

DUMITRESCU, R.G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk—where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med.** Vol. 9, p. 208–221, 2005.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. **Lancet.** Vol. 365, p. 1687 – 1717, 2005.

EDWARDS, J. e BARTLETT, J.M. Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity using DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor material by fluorescence-based multiplex microsatellite PCR. **Methods Mol.Biol.** Vol. 226, p. 301 – 308, 2003.

EEROLA, H.; HEIKKILA, P.; TAMMINEN, A.; AITTOMAKI, K.; BLOMQUIST, C.; NEVANLINNA, H. Histopathological features of breast tumours in BRCA1, BRCA2, and in mutation negative breast cancer families. **Breast Cancer Res.** Vol. 7, p. 93–100, 2003.

EIRIKSDOTTIR, G., SIGURDSSON, A., JONASSON, J. G., AGNARSSON, B. A., SIGURDSSON, H., GUDMUNDSSON, J., BERGTHORSSON, J. T., BARKARDOTTIR, R. B., EGILSSON, V.; INGVARSSON, S. Loss of heterozygosity on chromosome 9 in human breast cancer: association with clinical variables and genetic changes at other chromosome regions. **Int. J. Cancer**. Vol. 64, p. 378–382, 1995.

ELLEGREN, H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. **Nat Genet**. Vol. 24, p. 400–402, 2000.

ELLEGREN, H. Human mutation-blame (mostly) men. **Nat Genet**. Vol. 31, p. 9–10, 2002.

ELLSWORTH, R.E.; ELLSWORTH, D.L.; LUBERT, S.M.; HOOKE, J.; SOMIARI, R.I.; SHRIVER, C.D. High-Throughput Loss of Heterozygosity Mapping in 26 Commonly Deleted Regions in Breast Cancer (short communications). **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. Vol. 12, p. 915-919, 2003.

ELLSWORTH, R.E.; ELLSWORTH, D.L.; NEATROUR, D.M.; DEYARMIN, B.; LUBERT, S.M.; SARACHINE, M.J.; BROWN, P.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Allelic Imbalance in Primary Breast Carcinomas and Metastatic Tumors of the Axillary Lymph Nodes. **Molecular Cancer Research**. Vol. 3, n° 2, p. 71-77. 2005.

ELLSWORTH, R.E.; ELLSWORTH, D.L.; LOVE, B.; PATNEY, H.L.; HOFFMAN, L.R.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Correlation of Levels and Patterns of Genomic Instability With Histological Grading of DCIS. **Annals of Surgical Oncology**, 2007.

ELLSWORTH, R.E.; HOOKE, J.A.; LOVE, B.; KANE, J.L.; PATNEY, H.L.; ELLSWORTH, D.L.; SHRIVER, C.D. Correlation of levels and patterns of genomic instability with histological grading of invasive breast tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2008.

FEARON, E. R. & VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. Vol. 1, n° 61, p. 759–767, 1990.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D.M. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. **IARC Cancer Base**. Vol. 5, n° 1, p. 865-886, 2001.

FISHER, E.R.; ANDERSON, S.; REDMOND, C.; *et al.* Pathologic findings from the NSABP Protocol B06. 10 year pathologic and clinical prognostic discriminants. **Cancer**. Vol. 8, p. 2507, 1993.

FOSTER, S.A.; WONG, D.J.; BARRET, M.T.; GALLOWAY, D.A. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. **Molecular and Cell Biology**. Vol. 18 (4), p. 1793 – 1801, 1998.

FOUNTAIN, J.W.; KARAYIORGOU, M.; ERNSTOFFS, M.S.; KIRKWOOD, J.M.; VLOCK, D.R.; TITUS-ERNSTOFFS, L.; BOCHARK, B.; VIJAYASARADH, S.; HOUGHTON, A.N.; LAHT, J.; KIDD, V.J.; HOUSMAN, D.E.; DRACOPOLI, N.C. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. **Proc Natl Acad Sci**. Vol. 89, p. 10557-10561, 1992.

FUJII, H.; ANBAZHAGAN, R.; BORNMAN, D.M.; GARRET, E.S.; PERLMAN, E.; GABRIELSON, E. Mucinous cancers have fewer genomic alterations than more common classes of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. Vol. 76, p. 255–260, 2002.

FU Q, YAO GY, TANG XL, CHEN LR, ZHENG ZX. Microsatellite instability and allele-specific chromosome 3p deletion in breast cancer and precancerous lesions, **Chinese Journal of Oncology**. Vol. 29 (1), p. 34-40, 2007.

GANG, W.; HUANG, C.H.; ZHAO, Y.; CAI, L.; WANG, Y.; XIU, S.J.; JIANG, Z.W.; YANG, S.; ZHAO, X.T.; HUANG, W. GUI, J.R. Genetic aberration in primary hepatocellular carcinoma: correlation between p53 gene mutation and loss-of-heterozygosity on chromosome 16q21-q23 and 9p21-23. **Cell Research**. Vol. 10, p. 311-323, 2000.

GEDDES, M.; PARKIN, D.M.; KHLAT, M.; BALZI, D.; BUIATTI, E. Cancer in Italian Migrants Populations. **IARC**. Vol. 123, 1993.

GENOME DATABASE. Disponível em: <<http://www.gdb.org>>. Acesso em 25/02/2008.

GIKAS PD, MOKBEL K. Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. **Int J Fertil Womens Med**. Vol. 50, p. 250–258, 2005.

GONZALEZ, M.V.; PELLO, M.F.; LOPEZ-LARREA, C, SUAREZ, C.; MENENDEZ, M.J.; COTO, E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and

p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Cancer Res.** Vol. 1, p. 1043 – 1049, 1995.

GORGOULIS, V.G.; KOUTROUMBI, E.N.; KOTSINAS, A.; ZACHARATOS, L.P.; MARKOPOULOS, C.; GIANNIKOS, L.; KYRIAKOU, V.; VOULGARIS, S.Z.; GOGAS, I.; KITTAS, C. Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-p22 in sporadic invasive breast carcinomas. **Molecular Medicine.** Vol. 4, p. 807 – 822, 1998.

GORGOULIS, V.G.; VASSILIOU, L.V.; KARAKAIDOS, P.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; LILOGLOU, T.; VENERE, M.; DITULIO, R.A.Jr.; KASTRINAKIS, N.G.; LEVY, B.; KLETSAS, D.; YONETA, A.; HERLYN, M.; KITTAS, C.; HALAZONETIS, T.D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature.** Vol. 434, p. 907-913, 2005.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Introdução a Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HABER, D.A. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF. **Cell.** Vol. 91, p. 555–1558, 1997.

HAMAJIMA, N.; HIROSE, K.; TAJIMA, K.; ROHAN, T.; CALLE, E.E.; HEATH, C.W. Jr.; COATES, R.J.; LIFF, J.M.; TALAMINI, R.; CHANTARAKUL, N.; *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer.** Vol. 87, p. 1234-1245, 2002.

HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. Towards an integrated model for breast cancer etiology—the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. **Breast Cancer Res.** Vol. 6, p. 213–218, 2004.

HENDERSON, B.E.; ROSS, R.; BERNSTEIN, L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. **Cancer Research.** Vol. 44, p. 29-39, 1991.

HERMAN, J.G.; MERLO, A.; MAO, L.; LAPIDUS, R.G.; ISSA, J.P.J.; DAVIDSON, N.E.; SIDRANSKY, D.; BAYLIN, S.B. Inactivation of the CDKN2/p16/MTSJ Gene Is Frequently Associated with Aberrant DNA Methylation in All Common Human Cancers. **Cancer Research.** Vol. 55, p. 4525 – 4530, 1995.

HEYWANG, S.H.; SCHREER, I.D.; ERSRAW, D.D. Diagnostic breast imaging. Stuttgart New York: **Thieme**, 1997.

HILL, T.D.; KHAMIS, H.J.; TYCZYNSKI, J.E.; BERKEL, H.J. Comparison of male and female breast cancer incidence trends, tumor characteristics, and survival. **Ann Epidemiol.** Vol. 15, p. 773–780, 2005.

HONRADO, E.; BENITEZ, J.; PALACIOS, J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. **Modern Pathology.** Vol. 18, p. 1305-1320, 2005.

HOPMAN, A.H.; KAMPS, M.A.; SPEEL, E.J.; SCHAPERS, R.F.; SAUTER, G.; RAMAEKERS, F.C. Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma *in situ* of the urinary bladder versus carcinoma *in situ* associated with carcinoma, **Am. J. Pathol.** Vol. 161, p. 1119–1125, 2002.

HUANG, Z.; HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A.; *et al.* Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. **JAMA.** Vol. 278, p. 1407-1411, 1997.

HUIPING, C.; SIGURGEIRSDOTTIR, J.R.; JONASSON, J.G.; EIRIKSDOTTIR, G.; JOHANNSDOTTIR, J.T.; EGILSSON V.; INGVARSSON, S. Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. **British Journal of Cancer.** Vol. 81(7), p. 1103–1110, 1999.

HULKA, B.S.; MOORMAN, P.G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas.** Vol. 38, p. 103–113, 2001.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Mortalidade: Tendência para os principais tipos. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Perfil da Incidência. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2006.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2008.

INGVARSSON, S. Molecular genetics of breast cancer progression. **Semin Cancer Biol.** Vol. 9, p. 277–288, 1999.

JEMAL, A.; CLEGG, L.X.; WARD, E, RIES, L.A.; WU, X.; JAMISON, P.M.; WINGO, P.A.; HOWE, H.L.; ANDERSON, R.N.; EDWARDS, B.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival. **Cancer.** Vol. 101, n° 1, p. 3–27, 2004.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer statistics 2007. **CA Cancer J Clin.** Vol. 57, n° 1, p. 43-66, 2007.

KALEMKERIAN GP, JIROUTEK M, ETTINGER DS, DORIGHI JA, JOHNSON KAMANGAR, F., DORES, G.M., AND ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology.** Vol. 24, p. 2137-2150, 2006.

KAMB, A.; GRUIS, N.A.; WEAVER-FELDHAUS, J.; LIU, Q.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.V.; STOCKERT, E.; DAY, R.S.I.; JOHNSON, B.E.; SKOLNICK, M.H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science.** Vol. 264, p. 436–440, 1994.

KEKEEVA, T.V.; POPOVA, O.P.; SHEGAI, P.V.; ALEKSEEV, B.I.; ADNREEVA, L.L.; ZALETAEV, D.V.; NEMTSOVA, M.V. Aberrant methylation of p16, HIC1, N33 and GSTP1 genes in tumor epithelium and tumor associated stromal cells of prostate cancer. **Mol Biol.** Vol. 41, n° 1, p. 79-85, 2007.

KEMP, C.; PETTI, D.A.; FERRARO, O.; ELIAS, S. Câncer de Mama – Prevenção Secundária. Sociedade Brasileira de Mastologia e Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, 2002.

KIM, Y., WON, Y.S.; PARK, K.S.; SONG, B.J.; KIM, J.S.; OH, S.J.; JEON, H.M.; JUNG, S.S.; PARK, W. Prognostic Significance of HER2 Gene Amplification According to Stage of Breast Cancer. **J Korean Med Sci.** Vol. 23, p. 414 – 420, 2008.

KITTINIYOM, K.; GORSE, K.M.; DALBEQUE, F.; LICHY, J.H.; TAUBENBERGER, J.K.; NEWSHAM, I.F. Allelic loss on chromosome band 18p11.3 occurs early and reveals heterogeneity in breast cancer progression. **Breast Cancer Res.** Vol. 3, epub ahead of print, 2001.

KLIEWER, E.V.; SMITH, K.R. Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada. **J Natl Cancer Inst.** Vol. 87, p. 1154–1161, 1995.

KNUDSON, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci.** Vol. 68, n^o. 4, p. 820-823, 1971.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Research.** Vol. 45, p. 1437-1443, 1985.

KREIKE, B.; KOUWENHOVE, M.V.; HORLINGS, H.; WEIGELT, B.; PETERSE, H.; BARTELINK, H.; VIJVER, M.J.V. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Research.** Vol. 9, 2007.

KUBBA, A.A. Breast cancer and the pill. **J R Soc Med.** V. 96, p. 280–283, 2003.

LAGERROS, Y.T.; HSIEH, S.F.; HSIEH, C.C. Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. **Eur J Cancer Prev.** Vol. 13, p. 5–12, 2004.

LAHMANN, P.H.; HOFFMANN, K.; ALLEN, N.; *et al.* Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). **Int J Cancer.** Vol. 111, p. 762–771, 2004.

LAKHANI, S.R.; EASTON, D.F.; STRATTON, M.R.; *et al.* Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. **Lancet.** Vol. 349, p. 1505–1510, 1997.

LAKHANI, S.R.; JACQUEMIER, J.; SLOANE, J.P.; *et al.* Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. **J Natl Cancer Inst.** Vol. 90, p. 1138–1145, 1998.

LASKO, D.; CAVENEE, W.; NORDENSKJOLD, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annu Rev Genet.** Vol. 25, p. 281 – 314, 1991.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature.** Vol. 396, p. 643 - 649, 1998.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol Biol Evol.** Vol. 4, p. 203 – 221, 1987.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocr. Rev.** Vol. 21, p. 40-54, 2000.

LIGGETT, W.H.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **J. Clin. Oncol.** Vol. 16, p. 1197 – 1206, 1998.

LI, Y.; MILLIKAN, R. C.; BELL, D. A.; CUI, L.; TSE, C. J.; NEWMAN, B.; CONWAY, K. Cigarette smoking, cytochrome p4501A1 polymorphisms, and breast cancer among African-American and white women. **Breast Cancer Res.** Vol. 6, p. 460-473, 2004.

LOI, S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers – What have we learnt? **European Journal of Cancer.** Vol. 44, p. 2813 – 2818, 2008.

LYNCH, B.J.; HOLDEN, J.A.; BUYS, S.S.; NEUHAUSEN, S.L.; GAFFNEY, D.K. Pathobiologic characteristics of hereditary breast cancer. **Hum Pathol.** Vol. 29, p. 1140–1144, 1998.

MAITRA, A.; WISTUBA, I.I.; WASHINGTON, C.; VIRMANI, A. K.; ASHFAQ, R.; MILCHGRUB, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. **The American journal of pathology.** Vol. 159, n. 1, p. 119-30, 2001.

MALKIN, D.; LI, F.; STRONG, L.; FRAUMENI, J.F.Jr; NELSON, C.E.; KIM, D.H.; KASSEL, J.; GRYKA, M.A.; BISCHOFF, F.Z.; TAINSKY, M.A.; *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science.** Vol. 250, p. 1233–1238, 1990.

MANUAL APPLIED BIOSYSTEMS. Evaluating Genetic Analysis Systems: Microsatellite Analysis. Disponível em <www.appliedbiosystems.com>. Acesso em 01/09/2008.

MAO, X.; HAMOUDI, R.A.; ZHAO, P.; BAUDIS, M. Genetic losses in breast cancer: toward an integrated molecular cytogenetic map. **Cancer Genetics and Cytogenetics.** Vol. 160, p. 141-151, 2005.

MARCHBANKS, P.A.; MCDONALD, J.A.; WILSON, H.G.; *et al.* Oral contraceptives and the risk of breast cancer. **N Engl J Med.** V. 346, p. 2025–32, 2002.

MARIATOS, G.; GORGOULIS, V.G.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; VOGIATZI, T.; RASSIDAKIS, G.; FOUKAS, P.; LILOGLOU, T.; TINIAKOS, D.; ANGELOU, N.; MANOLIS, E.N.; VESLEMES, M.; FIELD, J.K.; KITTAS, C. Expression of p16(INK4A) and alterations of the 9p21-23 chromosome region in non-small-cell lung carcinomas: relationship with tumor growth parameters and ploidy status. **International Journal of Cancer.** Vol. 89, n^o 2, p. 133-141, 2000.

MARSH, K. L.; VARLEY, J. M. Loss of heterozygosity at chromosome 9p in ductal carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of the breast. **Br. J. Cancer.** Vol. 77, p. 1439–1447, 1998.

MARTINEZ, M. A. R. Estudo das alterações do microssatélites D6S251 e D6S252 no carcinoma basocelular esporádico. **Faculdade de medicina da universidade de São Paulo**, São Paulo, 2006.

MATSUMOTO S, MINOBE K, UTADA Y, FURUKAWA K, ONDA M, SAKAMOTO G, KASUMI F, NAKAMURA Y, EMI M. Loss of heterozygosity at 3p24-p25 as a prognostic factor in breast cancer. **Cancer Letters.** Vol.152, p.63-69, 2000.

McPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M. ABC of breast diseases: breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ.** Vol. 321, p. 624–628, 2000.

McTIERNAN, A.; RAJAN, K.B.; TWOROGER, S.S.; IRWIN, M.; BERNSTEIN, L.; BAUMGARTNER, R.; GILLILAND, F.; STANCZYK, F.Z.; YASUI, Y.; BALLARD-BARBASH, R. Adiposity and sex hormones in postmenopausal breast cancer survivors. **J Clin Oncol.** Vol. 21, p. 1961–1966, 2003.

MEMIS, A.; OZDEMIR, N.; PARILDAR, M.; USTUN, E.E.; ERHAN, Y. Mucinous (colloid) breast cancer mammographic and US features with histologic correlation. **Euro J Radiol.** Vol. 35, p. 39 – 43, 2000.

MERLO, A.; GABRIELSON, E.; MABRY, M.; VOLLMER, R.; BAYLIN, S.B.; SIDRANSKY, D. Homozygous deletion on chromosome 9p and loss of heterozygosity on 9q, 6p and 6q in primary human small cell lung cancer. **Cancer Research.** Vol. 54, n^o 9, p. 2322-2326, 1994.

MILLER, B.J.; WANG, D.; KRAHE, R.; WRIGHT, F.A. Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for

multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions. **Am J Hum Genet.** Vol. 73, p. 748–767, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Como ajudar as mães a amamentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.

MIYAKIS, S.; SPANDIDOS, D.A.; Allelic loss in breast cancer. **Cancer detection and prevention.** Vol. 26, n^o 6, p. 426-434, 2002.

MOHSIN, S.K.; O'CONNELL, P.; ALLRED, D.C.; LIBBY, A.L. Biomarker profile and genetic abnormalities in lobular carcinoma in situ. **Breast Cancer Research and Treatment.** Vol. 90, p. 249 – 256, 2005.

MOLECULAR GENETICS – DNA, RNA & PROTEINS. Disponível em: <fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm>. Acesso em: 30/08/3008.

MUSGROVE, E.A.; LILISCHKIS, R.; CORNISH, A.L.; LEE, C.S.L.; SETLUR, V.; SESHADRI, R.; SUTHERLAND, R.L. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16INK4, p15INK4B and p21WAF1/CIP1 in human breast cancer. **Int J Cancer.** Vol. 63, p. 584–591, 1995.

NAQVI, R.A.; HUSSAIN, A.; RAISH, M.; NOOR, R.; SARI, M.S.R.; KUKRETI, H.; KHAN, N.J.; AHMAD, S.; DEO, S.V.S.; HUSAIN, S.A.; PASHA, S.T.; BASIR, S.F.; SHUKLA, N.K. Specific 5'CpG island methylation signatures of FHIT and p16 genes and their potential diagnostic relevance in Indian breast cancer patients. **DNA and Cell Biology.** Vol. 27 (9), p. 517 – 525, 2008.

NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. *BRCA1* and *BRCA2*. **Nature Reviews.** Vol. 4, p. 665-676; 2004.

NGUYEN, D. X. & MASSAGUE, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nature Rev. Genet.** Vol. 8, p. 341–352, 2007.

NIELSEN, N.H.; ROOS, G.; EMDIN, S.O.; LANDBERG, G. Methylation of the p16 (Ink4a) tumor suppressor gene 59-CpG island in breast cancer. **Cancer Lett.** Vol. 163, p. 59–69, 2001.

NOBORI, T.; MIURA, K.; WU, D.J.; LOIS, A.; TAKABAYASHI, K.; CARSON, D.A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **Nature.** Vol. 368, p. 753–756, 1994.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6 ed. W.B. Saunders Company, 2001.

OLDENBURG, R.A.; KROEZE-JANSEMA, K.; MEIJERS-HEIJBOER, E.J.; VAN ASPEREN, C.J.; HOOGERBRUGGE, N.; LEEUWEN, I.; VASEN, H.F.; CLETON-JANSEN, A.M.; KRAAN, J.; HOUWING-DUISTERMAAT, J.J.; MORREAU, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Characterization of familial non-*BRCA1/2* breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping. **Clin Cancer Res**. Vol.12, p. 1693–1700, 2006.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. Vol. 63, p. 125-149, 2007.

OLIVEIRA, M.M.C. **Análise de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 (3p) em pacientes com carcinoma mamário esporádico**. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

OREL, S.G.; MENDONCA, M.H.; REYNOLDS, C.; SCHNALL, M.D.; SOLIN, L.J.; SULLIVAN, D.C. MR imaging of ductal carcinoma in situ. **Radiology**. Vol. 202, p. 413-420, 1997.

OTSUKI, T.; CLARK, H.M.; WELLMANN, A.; JAFFE, E.S.; RAFFIELD, M. Involvement of *CDKN2 (p16INK4A/MTS1)* and *p15INK4B/MTS2* in human leukemias and lymphomas. **Cancer Res**. Vol. 55, p. 1436–1440, 1995.

PAIK, S.; SHAK, S.; TANG, G.; *et al.* Expression of the 21 genes in the Recurrence Score Assay and Tamoxifen clinical benefit in the NSABP study B-14 of node negative, estrogen receptor positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2005 **ASCO Annual Meeting Proceeding**. Vol. 23, N° 16S (June 1 Supplement), 2005.

PALACIOS, J.; HONRADO, E.; OSORIO, A.; CAZORLA, A.; SARRIO, D.; BARROSO, A.; RODRIGUEZ, S.; CIGUDOSA, J.C.; DIEZ, O.; ALONSO, C.; LERMA, E.; SANCHEZ, L.; RIVAS, C.; BENITEZ, J. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to *BRCA1* or *BRCA2* mutations: differences from breast carcinomas arising in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Clin Cancer Res**. Vol. 9, p. 3606–3614, 2003.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, 49 (1):33–64,1999.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**. Vol. 37, p. 54-66, 2001.

PARKIN, D.M. International variation. **Oncogene**. Vol. 23, n° 38, p. 6329-40, 2004.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. Vol. 406, p. 747 – 752, 2000.

PERUCHO, M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. **Biological Chemistry**. Vol. 377, p. 675-84, 1996.

PIAO, Z.; PARK, C.; LEE, J.S.; YANG, C.H.; CHOI, K.Y.; KIM, H. Homozygous deletions of the *CDKN2* gene and loss of heterozygosity. **Cancer Letters**. Vol. 122, p. 201-207, 1998.

PLUQUET, O.; HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Lett**. Vol. 174, p. 1–15. 2003.

POLYAK, K.; HAHN, W.C. Roots and stems: stem cells in cancer. **Nature Medicine**. Vol. 11, p. 296 – 300, 2006.

PRESTI, J. C.; WILHELM, M.; REUTER, V.; RUSSO, P.; MOTZER, R.; WALDMAN, F. Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. **The Journal of Urology**. Vol. 167, p. 1464-1468, 2002.

PRITCHARD, K. Predictive molecular markers: hormone receptor status. Program and abstracts of the 3rd International BCIRG Conference. Los Angeles, 2002.

PROPST, G.B. **Análise de perda de heterozigose na região 9p em portadores de tumores malignos de cavidade bucal**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PUSZTAI, L. ; AYERS, M. ; STEC, J. ; *et al.* Gene expression profiles obtained from single passage fine needle aspirations (FNA) of breast cancer reliably identify prognostic/predictive markers such as estrogen (ER) and HER-2 receptor status and reveal large scale molecular differences between ER-negative and ER-positive tumors. **Clin Cancer Res**. Vol. 9, p. 2406 – 2415, 2003.

QAYYUM, A.; BIRDWELL, R.L.; DANIEL, B.L.; NOWELS, K.W.; JEFFREY, S.S.; AGOSTON, T.A.; HERFKENS, R.J. MR imaging features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: Histopathologic correlation. **AJR**. Vol. 178, p. 1227-1232, 2002.

ROUZIER, R.; PEROU, C.M. ; SYMMANS, W.F. ; *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**. Vol. 1, p. 5678 – 5685, 2005.

RUSH, E.B.; ABOUEZZI, Z.; BORGEN, P.I.; ANELLI, A. Analysis of MTS1/ CDK4 in female breast carcinomas. **Cancer Lett**. Vol. 89, p. 223–226, 1995.

RUSH, E.B.; CALVANO, J.E.; VAN ZEE, K.J.; ZELENETZ, A.D.; BORGEN, P.I. Microsatellite instability in breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**. Vol. 4(4), p. 310-315, 1997.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. Vol. 102, p. 89-96, 2006.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Res**. Vol. 20, p. 211–215, 1992.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**. Vol.109, p. 365-371. 2000.

SCHWARZENBACH, H.; MULLER, V.; BEEGER, C.; GOTTBURG, M.; STAHMANN, N.; PANTEL, C. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. **Breast Cancer Research**. Vol. 9, n° 5. 2007.

SCOTT, C.L.; JENKINS, M.A.; SOUTHEY, M.C.; DAVIS, T.A.; LEARY, J.A.; EASTON, D.F.; PHILLIPS, K.A.; HOPPER, J.L. Average age specific cumulative risk of breast cancer according to type and site of germline mutations in BRCA1 and BRCA2 estimated from multiple-case breast cancer families attending Australian family cancer clinics. **Hum Genet**. Vol. 112, p. 542–551, 2003.

SERRANO, M.; HANNON, G.J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**. Vol. 366, p. 704-707, 1993.

SHAHNAVAZ, S.A.; BRADLEY, G.; REGEZI, J.A.; THAKKER, N.; GAO, L.; HOGG, D.; JORDAN, R.C.K. Patterns of CDKN2A Gene Loss in Sequential Oral Epithelial Dysplasias and Carcinomas. **Cancer Res.** Vol. 6, p. 2371–2375, 2001.

SHAO, Z.M.; NGUYEN, M.; BARSKY, S.H. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. **Oncogene.** Vol. 19, n° 38, p. 4337-45, 2000.

SHAPIRO, S.; SMART, C.R.; COSTANZA, M.E.; HENSON, D.E.; HOLLEB, A.I.; HUTTER, R.V.; KRAMMER, B.; KUSHNER, H.D.; McLELLAND, R.; MOSKOWITZ, M.; *et al.* Guidelines for breast cancer screening. **Cancer.** Vol. 69, p.2001-2002, 1992.

SHARMA, G.; MIRZA, S.; PRASAD, C.P.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.D.; RALHAN, R. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. **Life Sci.** Vol. 80, n° 20, 1873-1881, 2007.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science.** Vol. 274, n° 5293, p. 1672-1677, 1996.

SHERR, C.J. The ARF/p53 pathway. **Curr Opin Genet Dev.** Vol. 10, p. 94 – 99, 2000.

SHERR, C.J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nat Rev Mol Cell Biol.** Vol. 10, p. 731 – 737, 2001.

SILVA, H.M.S.; ROCHA, M.L.L.; BARINI, R.C.T.; RESENDE, L.L.; REIS, J.H.P.; PAULA, R.A.; VILCHES, S.K. Radioguided surgery in mastology. **Feminina.** Vol. 34, p. 667–672, 2006.

SINGLETERY, S.E. Systemic treatment following sentinel lymph node biopsy in breast cancer: who, what, and why? **Jam Coll Surg.** Vol. 192, p. 220-230. 2001.

SMEDS, J.; RNBERG, F.W.A.; NORBERG, T.R.N.; NORDGREN, H.; HOLMBERG, L.; BERGH, J. Ductal carcinoma in situ of the breast with different histopathological grades and corresponding new breast tumour events: Analysis of loss of heterozygosity. **Acta Oncologica.** Vol. 44, p. 41-/49, 2005.

SORLIE, T. ; PEROU, C.M. ; TIBSHIRANI, R. ; *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA.** Vol 98, p. 10869 –10874, 2001.

SORLIE, T. ; TIBSHIRANI, R. ; PARKER, J. ; *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol 100, p. 8418 – 8423, 2003.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.Y.; MCSHANE, L.M.; *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol. 100, p. 10393 – 10398, 2003.

SOUFIR, N.; QUEILLE, S.; LIBOUTET, M.; THIBAudeau, O.; BACHELIER, F.; DELESTAING, G.; BALLOY, B.C.; BREUER, J.; JANIN, A.; DUBERTRET, L.; VILMER, C.; BASSET-SEGUIN, N. Inactivation of the CDKN2A and p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. **Br J Dermatol**. Vol. 156, n° 3, p. 448-453, 2007.

SPRUCK, C.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; SHIBITA, A.; SIMONEAU, A. R.; LIN, M. F.; GONZALEZ, F.; TSAI, Y. C.; JONES, P. A. p16 gene in uncultured tumours. **Nature**. Vol. 370, p. 183 - 184, 1994.

STONE, J.; DITE, G.S.; GUNASEKARA, A.; DITE, G.S.; GUNASEKARA, A.; ENGLISH, D.R.; McCREDIE, M.R.; GILES, G.G.; CAWSON, J.N.; HEGELE, R.A.; CHIARELLI, A.M.; YAFFE, M.J.; BOYD, N.F.; HOPPER, J.L. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. **Cancer Epidemiol Biomar Prev**. Vol. 15, p. 612–617, 2006.

TAN, B. T.; PARK, C. Y.; AILLES, L. E. & WEISSMAN, I. L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. **Lab. Invest**. Vol. 86, p. 1203–1207, 2006.

THIAGALINGAM, S.; FOY, R.L.; CHENG, K.; LEE, H.J.; THIAGALLINGAM, A.; PONTE, J.F. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: Molecular basis of its occurrence. **Current opinion in oncology**. Vol. 14, p. 65 -72, 2002.

THIBODEAU SN, BREN G, SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**. Vol. 260, p. 816-819, 1993.

THOMPSON, D.; EASTON, D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. **J Mamm Gland Biol Neoplas**. Vol. 9, p. 221–236, 2004.

THORLACIUS, S.; SIGURDSSON, S.; BJARNADOTTIR, H.; OLAFSDOTTIR, G.; JONASSON, J.G.; TRYGGVADOTTIR, L.; TULINIUS, H.; EYFJORD, J.E. Study of a

single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. **Am J Hum Genet.** Vol. 60, p. 1079–1084, 1997.

TLSTY, T.D.; CRAWFORD, Y.G.; HOLST, C.R.; FORDYCE, C.A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M.L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.** Vol. 9, No. 3, 2004.

TNM: Estadiamento dos tumores de mama. SPCC - Hospital São Marcos Clínica de Ginecologia e Mastologia UICC – União Internacional Contra o Câncer - TNM 6ª edição.

TOKUNAGA, M.; LAND, C.E.; YAMAMOTO, T.; ASANO, M.; TOKUOKA, S.; EZAKI, H.; NISHIMORI, I. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950–1980. **Radiat Res.** Vol. 112, p. 243–272, 1987.

TOMLINSON, I.P.M.; LAMBROS, M.B.K.; ROYLANCE, R.R. Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? **Genes, chromosomes & cancer.** Vol. 34, p. 349–353. 2002.

TRENTAM-DIETZ, A.; NEWCOMB, P.A.; EGAN, K.M.; *et al.* Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). **Cancer Causes Control.** Vol. 11, p. 533-542, 2000.

TUMOR SUPPRESSOR GENE INACTIVATION OR DELETION. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 30/08/2008.

TYCZYNSKI, J.; TARKOWSKI, W.; PARKIN, D.M.; ZATONSKI, W. Cancer mortality among polish migrants to Australia. **Eur J Cancer.** Vol. 30A, p. 478-484, 1994.

UICC (2009). Disponível em: <http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=14296&Itemid=428>. Acesso em : 27/01/09.

VAN DER RIET, P.; NAWROZ, H.; HRUBAN, R.H.; CORTO, R.; TOKINO, K.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Frequent Loss of Chromosome 9p21-p22 Early in Head and Neck Cancer Progression. **Cancer Research.** Vol. 54, p. 1156-1158, 1994.

VAN GILS, C.H.; HENDRIKS, J.H.; OTTEN, J.D.; HOLLAND, R.; VERBEEK, A.L. Parity and mammographic breast density in relation to breast cancer risk: indication of interaction. **Eur J Cancer Prev.** Vol. 9, p. 105–111, 2000.

VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature.** Vol. 415, p. 530–536, 2002.

VAN'T VEER, L. J. & WEIGELT, B. Road map to metastasis. **Nature Med.** Vol. 9, p. 999 – 1000, 2003.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer.** Vol. 7, p. 659 – 672, 2007.

VENKITARAMAN, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell.** Vol. 108, p. 171 – 182, 2002.

VERDORFER, I.; HOBISCH, A.; HITTMAIR, A.; DUBA, H.C.; BARTSCH, G.; UTERMANN, G.; ERDEL, M. Cytogenetic characterization of 22 human renal cell tumors in relation to a histopathological classification, **Cancer Genet. Cytogenet.** Vol. 111, p. 61–70, 1999.

WABER, P.; DLUGOSZ, S.; CHENG, Q.C.; TRUELSON, J.; NISEN, P.D. Genetic alterations of chromosome band 9p21-p22 in head and neck cancer are not restricted to p16^{INK4a}. **Oncogene.** Vol. 15, p. 1699-1704, 1997.

WANG, Z.C.; LIN, M.; WEI, L.J.; LI, C.; MIRON, A.; LODEIRO, G.; HARRIS, L.; RAMASWAMY, S.; TANENBAUM, D.M.; MEYERSON, M.; IGLEHART, J.D.; RICHARDSON, A. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. **Cancer Res.** Vol. 64, p. 64 – 71, 2004.

WEAVER, D.L.; ROSENBERG, R.D.; BARLOW, W.E.; ICHIKAWA, L.; CARNEY, P.A.; KERLIKOWSKA, K.; BUIST, D.S.M.; GELLER, B.M.; KEY, C.R.; MAYGARDEN, S.J.; BALLARD-BARBASH, R. Pathologic Findings from the Breast Cancer Surveillance Consortium – Population-based Outcomes in Women Undergoing Biopsy after Screening Mammography. **Cancer.** Vol. 106, n^o 4, 732-742, 2005.

WEBER, A.; WITTEKIND, C.; TANNAPFEL, A. Genetic and Epigenetic Alterations of 9p21 Gene Products in Benign and Malignant Tumors of the Head and Neck. **Pathology Research and Practice**. Vol. 199, p. 391-397, 2003.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L. & VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Rev. Cancer**. Vol. 5, p. 591–602, 2005.

WEINBERG, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**. Vol. 230, p. 770-776, 1985.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**. Vol. 245, p. 1138-1145, 1991.

WEINSTEIN, S.P.; OREL, S.G.; HELLER, R.; REYNOLDES, C.; CZERNIECKI, B.; SOLIN, L.J.; SCHNALL, M. MR imaging of the breast in patients with invasive lobular carcinoma. **AJR**. Vol. 176, p. 399-406, 2001.

XU, L.; SGROI, D.; STERNER, C.J.; BEAUCHAMP, R.L.; PINNEY, D.M.; KEEL, S.; UEKI, K.; RUTTER, J.L.; BUCKLER, A.J.; LOUIS, D.N.; GUSELLA, J.F.; RAMESH, V. Mutational analysis of *CDKN2* (*MTS1/p16ink4*) in human breast carcinomas. **Cancer Res**. Vol. 54, p. 5262–5264, 1994.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, I.M.T.; KAKUDO, K. Chromosome 3p and breast cancer, **American journal of human genetics**. Vol. 47(9), p. 453- 459, 2002.

YEE, J.C.; ROODI, N. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. **Cancer Research**. Vol. 54, p. 1641-1644, 1994.

ZAUBER, N.P.; SABBATH-SOLITARE, M.; MAROTTA, S.P.; MCMAHON, L.; BISHOP, D.T. Comparison of allelic ratios from paired blood and paraffin-embedded normal tissue for use in a polymerase chain reaction to assess loss of heterozygosity. **Mol Diagn**. Vol. 41, p. 29 – 35. 1999.

ZHANG, Q.X.; DING, Y.; LE, X.P.; DU, P. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues. **World J Gastroenterol**. Vol.9, p. 437- 441, 2003.

ZIEGLER, R.G.; HOOVER, R.N.; PIKE, M.C.; HILDESHEIM, A.; NOMURA, A.M.; WEST, D.W.; KOLONEL, L.N.; HORN-ROSS, P.L.; ROSENTHAL, J.F.; HYER, M.B. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. **J Natl Cancer Inst**. Vol. 85, p. 1819–1827, 1993.

ANEXOS

ANEXO 01	Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido.....	123
ANEXO 02	Questionário Pessoal.....	124
ANEXO 03	Tabela com dados clínicos e histopatológicos das pacientes.....	128
ANEXO 04	Tabela com informações sobre os marcadores para cada paciente.	143

ANEXO 01 – Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

Nome do estudo: “Análise de perda de heterozigose na região 9p em pacientes com carcinomas primários de mama”

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () M () F; Peso atual (kg): _____ ; Altura: _____
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence?
 Negróide () Caucasóide () Asiático () Indígena () Outros ()
- 4- Idade: _____
- 5- Local de nascimento: Paraná? () sim () não
 Se não: Que região brasileira? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste ()
 Sudeste ()
- 6- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () técnico () profissional () superior

Histórico de moradia

- 7- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?
 () alvenaria () madeira () barro () mista
- 8- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje
 () folha de zinco () brasilit-eternit () sapé () outro (qual?) _____

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

- 9- Qual a atividade profissional que exerceu ou exerce? Há quanto tempo?

- 10- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: _____

- | | | |
|---|---------|---------|
| Derivados de petróleo
(querosene, gasolina, solventes,...) | () sim | () não |
| Tintas/ corantes | () sim | () não |
| Indústrias têxteis ou tecelagem | () sim | () não |
| Praguicidas / Herbicidas | () sim | () não |
| Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...) | () sim | () não |
| Processamento de madeira | () sim | () não |
| Papel ou celulose | () sim | () não |
| Mineração | () sim | () não |
| Fábrica de sapatos ou curtume | () sim | () não |
| Metalúrgica | () sim | () não |
| Usina de açúcar ou álcool | () sim | () não |
| Plástico ou borracha | () sim | () não |
| Outras substâncias químicas: | () sim | () não |

- 11- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? (máscaras, luvas, óculos,...)

a) () sim b) () não

Histórico Tabagista

- 12- Você fuma atualmente? () sim () não
 13- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?
 a) () 0-5 anos b) () 5-10 anos c) () >10
 14- Quanto você fuma/fumava por dia? () menos de ½ maço
 () de meio a 1 maço
 () mais de um maço (quantos: _____)
 15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?
 a) () sim b) () não

Histórico de Etilismo

- 16- Você consome/consumiu bebidas alcóolicas com frequência? () sim () não
 17- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?
 a) () 0-5 anos. b) () 5 –10 anos. c) () mais 10 anos.
 18- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir?
 a) () Destiladas b) () Não-Destilada c) () Outra
 19- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?
 () no máximo um copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 () de 11 a 30 () mais de 30
 20- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?
 a) () Sim b) () Não

Histórico de Saúde

- 21- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? () sim () não () não me lembro
 22- Você se submeteu a algum Raio-X?
 () sim () não
 23- Se SIM, quantos? a) () Menos de 10 b) () Mais de 10
 Local: _____
 24- Você tem ou já teve as seguintes doenças?
 () Pressão alta () Diabetes () Tuberculose () Câncer
 (localização do tumor _____)
 25- Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?
 () Pai () Mãe () Irmão () Filho () Tio () Primo () Outro
 26- Qual era a localização do tumor?
 () Boca/garganta () Pulmão () Estômago () Intestino () Ginecológico () Mama
 () Outro (qual?) _____
 27- Você já teve alguma moléstia venérea?
 a) () sim Qual? _____ b) () não

Histórico hormonal e reprodutivo

- 28- Idade da primeira menstruação (menarca): _____
 29- Idade da última menstruação (menopausa): _____
 30- Sua menstruação é/era : () regular () irregular
 31- Teve abortos espontâneos? () sim Quantos: _____ () não
 32- Teve filhos? () sim Quantos: _____ () não
 33- Qual sua idade quando engravidou pela primeira vez? _____
 34- Usou ou usa pílulas anticoncepcionais?
 () sim Por quanto tempo: _____ () não

Marcadores Tumorais

ERBB2: _____

TP53: _____

REP: _____

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histo-patológico):

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
1	62	-	-	-	P	III	50	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
2	55	-	-	-	A	II	17	-	-	-	N	-	-	-	CDI	
3	50	15	45	-	A	II	40	D	3	-	-	POS	POS	-	CDI	
4	72	-	51	-	P	II	40	E	3	-	S	POS	-	NEG (0)	CDI	
5	71	12	50	-	A	II	35	D	-	-	-	-	-	-	CDI	
6	59	-	-	-	P	II	25	D	-	-	-	NEG	NEG	NEG (0)	CDI	
7	68	12	49	-	P	II	-	E	1	-	S	POS	POS	NEG (0)	CDI	Óbito pela doença
8	65	-	47	-	A	II	30	E	3	-	-	NEG	NEG	NEG	CDI	
9	58	-	-	-	P	II	55	E	-	-	-	-	-	-	CDI	
10	58	13	50	1a	A	II	10	D	2	28	N	POS	POS	NEG (0)	CDI	
11	54	-	-	-	P	II	55	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
12	48	-	-	-	A	II	60	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
13	47	-	-	-	P	III	-	-	-	-	-	NEG	NEG	POS	CDI	
14	55	-	-	-	P	I	19	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
15	47	-	-	-	P	II	45	E	-	-	-	POS	-	NEG (0)	CDI	Óbito pela doença
16	59	-	-	-	P	III	17	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
17	72	15	55	N	A	III	-	E	0	-	N	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
18	50	15	50	-	A	I	40	D	3	-	N	POS	-	NEG (0)	CDI	
19	44	12	44	21a	A	III	32	D	3	16	S	NEG	NEG	NEG (0)	CDI	
20	73	13	54	N	P	II	60	-	2	25	N	POS	POS	NEG (0)	CDI	
21	29	-	-	-	P	III	40	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
22	86	11	49	N	A	II	34	D	0	-	N	POS	POS	NEG (0)	CDI	
23	56	-	-	-	P	III	28	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
24	63	13	48	2a	A	II	20	-	2	25	N	POS	NEG	POS (3+)	CDI	
25	37	-	-	-	A	II	15	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
26	57	16	49	-	A	I	35	E	3	-	-	NEG	NEG	NEG (0)	CDI	
27	50	-	-	-	P	II	27	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
28	82	14	48	-	P	III	45	E	3	-	-	POS	POS	NEG (0)	CDI	
29	83	15	49	N	P	II	45	D	6	-	-	POS	POS	NEG	CDI	
30	59	12	53	10a	P	III	-	E	2	26	N	POS	NEG	NEG (1+)	CDI	
31	40	-	-	-	A	III	32	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
32	59	-	-	-	P	II	20	D	-	-	-	POS	POS	NEG (0)	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
33	71	-	-	-	-	II	60	-	-	-	-	POS	POS	-	CDI	
34	66	15	45	-	A	I	40	D	4	-	-	POS	POS	POS	CDI	
35	69	-	-	-	P	-	35	-	-	-	-	NEG	POS	-	CDI	
36	67	13	50	20a	A	III	30	D	9	18	S	POS	POS	NEG (0)	CDI	
37	41	-	-	-	A	II	50	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
38	68	13	57	10a	A	II	15	E	5	22	N	POS	POS	NEG (1+)	CDI	
39	48	16	-	-	A	I	20	D	1	-	-	POS	POS	NEG (0)	CDI	
40	63	13	55		A	I	40	D	4	-	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
41	53	-	-	-	P	II	70	-	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI	
42	45	16	-	S	P	III	50	D	1	35	N	POS	POS	NEG (1+)	CDI	
43	40	16	-	N	P	II	35	D	3	23	-	POS	POS	POS	CDI	
44	48	-	-	-	P	II	22	-	-	-	-	POS	-	POS (3+)	CDI	
45	60	-	-	-	A	II	30	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
46	56	11	52	-	P	II	40	D	1	-	-	POS	POS	POS	CDI	
47	39	13	-	N	P	II	45	D	1	-	-	POS	NEG	NEG (1+)	CDI	
48	75	14	50	N	A	III	27	D	8	20	-	POS	POS	NEG	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
49	73	-	-	-	P	III	20	E	2	-	-	-	-	-	CDI	
50	43	-	-	-	P	III	12	-	-	-	-	NEG	POS	POS (1+)	CDI	
51	39	11	N	-	P	III	40	-	0	-	-	NEG	NEG	NEG	CDI	
52	51	-	-	-	P	I	60	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
53	59	-	-	-	P	II	40	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	CDI	
54	54	-	-	-	A	II	40	-	-	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI	
55	47	13	N	-	A	III	15	-	2	35	-	POS	POS	POS	CDI	
56	51	14	N	-	A	II	20	E	-	-	-	NEG	POS	POS (3+)	CDI	Metástase hepática
57	42	-	-	-	A	I	50	-	-	-	-	NEG	POS	NEG	CDI	
58	89	14	50	-	P	III	35	D	-	-	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
59	37	-	-	-	P	III	-	E	-	-	-	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
60	60	14	55	-	A	III	20	E	0	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI	
61	50	14	N	-	P	III	30	D	2	23	-	NEG	POS	NEG (0)	CDI	
62	62	-	50	-	P	II	30	-	0	-	-	NEG	NEG	NEG (1+)	CDI	
63	45	13	N	-	P	III	57	E	2	24	-	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
64	44	10	N	-	A	II	-	-	2	20	-	POS	POS	POS	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
65	40	12	N	-	A	III	35	E	2	23	-	NEG	POS	NEG	CDI	
66	82	-	-	-	A	II	29	-	-	-	-	POS	POS	POS (2+)	CDI	
67	71	14	59	-	A	II	60	D	4	-	-	POS	-	NEG (1+)	CDI	
68	39	12	-	1a	P	II	40	D	0	-	N	POS	POS	NEG (0)	CDI	Bilateral
69	53	-	43	-	A	III	20	E	2	-	-	POS	POS	NEG (0)	CDI	
70	75	11	50	N	A	III	-	E	3	21	N	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
71	63	12	50	N	P	III	40	D	0	-	N	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
72	53	15	53	N	A	II	16	E	2	31	S	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
73	69	11	40	10a	A	I	12	E	6	22	S	POS	POS	NEG (1+)	CDI	
74	52	14	48	N	P	I	35	E	0	-	S	POS	POS	NEG (0)	CDI	
75	78	14	45	-	A	II	15	D	3	-	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
76	72	15	47	-	P	III	35	D	2	-	-	NEG	NEG	POS (3+)	CDI	
77	51	15	45	25a	A	III	15	D	1	32	N	POS	POS	POS (3+)	CDI	
78	56	13	54	N	P	II	20	D	3	26	N	POS	POS	NEG	CDI	
79	43	-	-	-	A	II	25	-	-	-	-	NEG	NEG	POS (1+)	CDI	
80	55	13	40	N	P	III	-	E	2	20	-	NEG	NEG	POS	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
81	78	-	50	-	A	II	14	D	2	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI	
82	27	13	-	7a	A	III	50	D	-	-	-	NEG	NEG	NEG	CDI	
83	30	15	-	N	A	II	25	-	-	-	-	-	-	-	CDI	
84	50	-	-	-	P	II	50	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
85	51	13	51	-	A	III	20	E	3	-	-	POS	POS	POS	CDI	
86	57	-	-	-	P	III	40	-	-	-	-	POS	NEG	POS (3+)	CDI	
87	49	-	-	-	P	II	25	-	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI	
88	41	12	-	-	P	II	25	E	2	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI	
89	75	11	48	N	A	II	25	E	2	23	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
90	47	13	-	-	P	III	30	D	1	22	-	POS	POS	POS (3+)	CDI	
91	33	-	-	-	P	-	50	-	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI	
92	42	13	-	-	P	I	25	D	0	-	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
93	39	13	-	10a	P	III	25	D	2	30	-	NEG	NEG	NEG (1+)	CDI	
94	38	10	-	22a	P	II	29	E	3	18	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI	
95	33	-	-	-	A	II	40	-	-	-	-	POS	NEG	NEG	CDI	
96	47	-	-	-	P	III	35	E	-	-	-	-	-	NEG (0)	CDI	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
97	81	-	-	-	A	I	15	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
98	90	-	-	-	P	II	65	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
99	74	9	50	N	A	II	23	D	0	-	N	POS	POS	POS (3+)	CDI	
100	51	-	-	-	A	II	65	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
101	66	-	-	-	P	III	30	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI	
102	63	-	-	-	A	III	35	-	-	-	-	NEG	NEG	-	CDI T2NMx	
103	61	-	-	-	P	II	20	-	-	-	-	POS	-	-	CDI T2N1bIIMx	
104	65	-	-	-	P	III	41	-	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI T2N2aMx	
105	58	-	-	-	P	III	55	-	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI T3N0Mx	
106	56	-	-	-	P	II	65	-	-	-	-	POS	-	-	CDI T4aN1bIIIMx	
107	62	12	50	-	P	II	8	D	3	-	-	NEG	NEG	POS (3+)	CDI apócrino / CDIS extenso sólido e comedocarcinoma	
108	54	-	-	-	P	II	40	-	-	-	-	POS	-	-	CDI com padrao lobular associado	
109	37	13	N	-	P	III	-	-	-	-	-	POS	POS	-	CDI multifocal e multicentrico T1N2bMx	
110	30	11	-	S	A	I	-	D	2	-	S	POS	POS	POS (3+)	CDI (5%) e CDIS (95%)	
111	45	15	45	N	P	II	13	D	2	21	N	POS	POS	NEG (1+)	CDI / CDIS	
112	52	-	-	-	P	II	80	-	-	-	-	-	-	-	CDI / áreas mucinosas	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
113	68	12	40	N	P	II	35	E	1	35	N	POS	-	NEG (1+)	CDI / Carcinoma Lobular Invasor	
114	52	-	-	-	A	II	13	E	-	-	-	POS	POS	NEG (2+)	CDI / CDIS	
115	78	-	-	-	A	II	45	-	-	-	-	POS	-	POS	CDI / CDIS	
116	62	-	-	-	A	II	32	E	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS	
117	45	-	-	-	P	III	38	E	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS	
118	69	11	-	N	A	II	-	D	2	24	-	POS	POS	NEG (0)	CDI / CDIS	Bilateral
119	87	16	54	N	P	II	83	E	2	20	-	-	-	-	CDI / CDIS	Óbito pela doença
120	57	12	53	10a	A	III	20	D	3	27	N	POS	-	POS (3+)	CDI / CDIS	
121	59	-	-	-	P	II	35	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG	CDI / CDIS	
122	71	-	-	-	P	III	60	-	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS padrao comedocarcinoma	
123	44	-	-	-	A	II	35	D	-	-	-	POS	POS	NEG (0)	CDI / CDIS cibriforme	
124	52	13	51	8a	A	II	30	D	2	-	N	NEG	NEG	NEG (0)	CDI / CDIS cibriforme	
125	34	-	-	-	P	II	55	-	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS cibriforme e comedocarcinoma	
126	47	-	-	-	P	III	40	E	3	-	N	NEG	-	POS (3+)	CDI / CDIS comedocarcinoma	
127	51	-	48	-	P	II	55	E	-	-	N	POS	POS	NEG (2+)	CDI / CDIS comedocarcinoma	óbito pela doença
128	53	13	48	2a	P	II	-	E	2	23	NO	POS	POS	NEG (0)	CDI / CDIS escasso	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
129	66	-	-	-	-	II	-	-	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS escasso (menos 25%) cibriforme	
130	53	-	-	-	P	III	17	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI / CDIS escasso comedocarcinoma e Carcinoma sólido tipo grandes células	
131	45	-	-	-	P	II	35	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI / CDIS escasso comedocarcinoma e cibriforme	
132	35	-	-	-	P	II	40	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS escasso sólido	
133	64	-	-	-	P	I	20	-	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS escasso sólido e comedocarcinoma	
134	74	-	-	-	A	I	20	-	-	-	-	POS	POS	-	CDI / CDIS extenso T2N0Mx	
135	40	-	-	-	P	II	30	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS extenso T2N1bIMx	
136	44	-	-	-	P	II	75	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS extenso cibriforme	
137	45	-	-	-	A	II	-	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS extenso comedocarcinoma e cibriforme	
138	62	-	-	-	P	II	30	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI / CDIS extenso sólido cibriforme comedocarcinoma / recidiva CDI com Carcinoma mucinoso T2N1bIIIMx	
139	64	-	-	-	P	II	10	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS extenso sólido grandes células e cibriforme	
140	71	-	-	-	A	II	18	-	-	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS micropapilar T2N1aMx	
141	40	-	-	-	P	II	35	E	-	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI / CDIS padrao sólido e cibriforme	
142	40	-	-	-	P	II	40	-	1	-	N	POS	-	NEG (0)	CDI / CDIS sólido	
143	77	-	50	N	P	II	70	-	3	23	S	-	-	-	CDI / CDIS sólido	
144	46	-	-	-	A	II	55	-	-	-	-	-	-	-	CDI / CDIS sólido e cibriforme	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
145	71	11	55	-	-	II	10	D	-	-	N	POS	POS	NEG (0)	CDI / CDIS sólido e comedocarcinoma (10%)	
146	65	16	53	N	P	II	-	E	3	21	-	-	-	NEG	CDI / CDIS sólido e comedocarcinoma (90%)	
147	63	15	57	6m	P	II	50	D	3	31	N	POS	-	NEG (0)	CDI / CDIS sólido escasso (menos 5%)	
148	58	13	45	-	A	II	19	E	3	-	-	POS	-	-	CDI / CDIS sólido escasso (menos 5%)	
149	52	-	-	-	A	II	10	E	-	-	-	-	-	-	CDI / comedocarcinoma T1cNxMx	
150	75	-	-	-	P	III	35	E	-	-	-	NEG	-	NEG (0)	CDI / Comedocarcinoma (menos 5%)	
151	62	12	54	N	A	II	25	E	3	20	N	NEG	NEG	NEG (0)	CDI / comedocarcinoma extenso (60%)	
152	76	-	-	-	P	III	80	-	-	-	-	-	-	-	CDI / componente inflamatório	
153	55	-	-	-	P	II	35	-	-	-	-	-	-	-	CDI /CDIS comedocarcinoma	
154	62	-	-	-	A	III	30	D	-	-	N	NEG	NEG	NEG (0)	CDI /CDIS comedocarcinoma cibriforme	
155	72	14	48	-	P	III	90	-	9	-	N	-	-	-	CDI /CDIS de padrao comedocarcinoma	
156	54	-	-	-	A	III	70	-	-	-	-	-	-	-	CDI /CDIS extenso tipo comedocarcinoma	
157	25	-	-	-	P	III	45	-	-	-	-	POS	-	-	CDI /CDIS sólido e cibriforme	
158	75	-	47	-	P	I	30	-	-	-	N	-	-	-	CDI /CDIS sólido e cibriforme	
159	56	13	49	-	P	III	40	E	3	-	-	POS	POS	POS (3+)	CDI /CDIS sólido escasso (menos 5%)	
160	47	11	-	2a	A	III	50	D	3	25	N	NEG	NEG	NEG	CDI apócrino	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
161	55	-	-	-	P	III	42	E	-	-	-	NEG	NEG	NEG (0)	CDI apócrino	Óbito pela doença
162	79	-	-	-	A	III	28	E	3	-	-	NEG	NEG	POS	CDI apócrino	
163	48	-	-	-	P	II	40	-	-	-	-	NEG	POS	POS (3+)	CDI apócrino	
164	38	-	-	-	P	III	30	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI apócrino / CDIS cibriforme e sólido	
165	53	-	-	-	P	II	30	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI apócrino / CDIS de grandes células sólido cibriforme papilar	
166	68	-	-	-	P	II	18	E	-	-	-	-	-	-	CDI apócrino / CDIS escasso comedocarcinoma micropapilar e sólido	
167	48	-	-	-	P	III	38	-	-	-	-	POS	-	-	CDI Apócrino / CDIS escasso sólido e comedocarcinoma	
168	46	-	-	-	P	II	48	-	-	-	-	POS	-	-	CDI apócrino / CDIS sólido cibriforme e micropapilar	
169	45	-	-	-	P	II	60	-	-	-	-	NEG	NEG	NEG (0)	CDI apócrino / CDIS sólido escasso (menos 5%)	
170	62	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	CDI com áreas de CDIS sólido e escasso	
171	63	-	-	-	A	II	15	-	-	-	-	POS	-	-	CDI metastático	
172	46	10	46	-	P	II	70	E	1	-	N	POS	-	POS (3+)	CDI multicentrico / CDIS	
173	62	12	55	13a	A	I	30	E	4	23	N	NEG	NEG	NEG (0)	CDI Multifocal e multicentrico / CDIS multifocal e multicentrico papilar e comedocarcinoma	
174	45	-	-	-	A	III	25	-	-	-	-	NEG	-	-	CDI multifocal sólido papilifero-cístico e de células fusiformes	
175	-	-	-	-	P	-	33	-	-	-	-	-	-	-	CDI recidivado	
176	43	-	-	-	P	II	16	-	-	-	-	POS	-	-	CDI residual	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
177	30	-	-	-	A	II	30	E	-	-	-	-	-	-	CDI residual T2N0Mx	
178	83	14	50	-	A	I	40	D	6	-	N	POS	POS	POS (3+)	CDI/ CDIS cibriforme	Bilateral
179	68	12	55	N	A	II	-	E	2	24	N	POS	POS	NEG (0)	CDI/ CDIS cibriforme	
180	69	-	-	-	A	II	10	E	4	-	S	-	-	-	CDI/ CDIS cibriforme (5%)	
181	86	-	-	-	A	II	15	-	-	-	S	-	-	-	CDI/CDIS sólido e cibriforme	
182	43	-	-	-	A	III	-	-	-	-	-	POS	-	-	CDI	
183	54	15	44	2a	P	II	32	E	-	-	-	POS	POS	NEG	CDI	
184	57	-	-	-	A	II	80	-	-	-	-	-	-	-	CDIS (95%) e CDI (5%)	
185	39	-	-	-	A	-	35	D	-	-	-	-	-	-	CDIS comedo sólido e cibriforme R2N0Mx	
186	74	14	48	-	A	I	60	D	13	17	-	POS	POS	NEG (1+)	CDIS sugestivo de invasão	
187	44	15	45	16a	P	-	-	-	2	21	-	NEG	NEG	POS (2+)	CDIS com disseminação pagetóide	
188	69	-	-	-	P	II	21	D	-	-	-	-	-	-	Carcinoma ductal com áreas tubulares (Carcinoma misto) / CDIS cibriforme	
189	72	12	55	N	A	I	40	E	0	-	N	POS	POS	POS (3+)	Carcinoma de ducto mamário	
190	66	11	-	N	P	III	50	E	10	19	S	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma de ducto mamário	
191	60	11	50	5a	A	I	12	-	0	-	S	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma de ductos mamários	
192	71	16	52	23a	P	II	35	E	1	33	N	POS	POS	POS (3+)	Carcinoma ductal	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
193	46	11	-	5a	P	II	-	-	3	20	N	POS	POS	NEG (2+)	Carcinoma ductal	
194	41	-	-	-	P	II	10	-	-	-	-	NEG	-	-	Carcinoma Ductal T2N1bIMx	
195	73	-	-	-	P	II	20	E	3	-	S	POS	NEG	POS (3+)	Carcinoma ductal de mama	
196	72	13	52	N	A	I	35	E	3	21	-	POS	POS	POS (3+)	Carcinoma ductal multicentrico	
197	55	-	50	-	P	II	60	D	1	-	-	POS	POS	NEG (1+)	Carcinoma Lobular Invasor	
198	63	12	45	-	P	I	40	E	4	-	N	POS	-	NEG (1+)	Carcinoma Lobular Invasor	
199	55	-	-	-	P	-	13	-	-	-	-	POS	-	-	Carcinoma Lobular Invasor	
200	84	12	50	N	-	I	-	-	3	18	-	-	-	-	Carcinoma Lobular Invasor	
201	44	12	44	10a	A	II	25	-	1	25	N	POS	POS	NEG (1+)	Carcinoma Lobular Invasor	
202	44	13	-	S	A	II	27	E	3	22	S	POS	-	NEG (0)	Carcinoma Lobular Invasor	
203	66	-	-	-	P	II	-	-	-	-	-	POS	NEG	NEG	Carcinoma Lobular Invasor	
204	72	11	35	N	A	-	50	-	0	-	S	-	-	-	Carcinoma Lobular Invasor	
205	64	-	48	-	A	II	10	D	2	-	-	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma Lobular Invasor	
206	52	12	46	-	A	II	27	E	4	-	-	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma Lobular Invasor	
207	46	15	50	N	P	II	60	E	2	23	S	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma Lobular Invasor	
208	55	11	48	4m	P	II	50	D	4	25	N	POS	POS	NEG	Carcinoma Lobular Invasor	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pilula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
209	46	15	45	-	A	II	50	D	0	-	-	POS	POS	POS (3+)	Carcinoma Lobular Invasor	
210	69	-	46	-	A	II	17	D	1	-	-	POS	POS	NEG (2+)	Carcinoma Lobular Invasor / Carcinoma Lobular "in situ" (10%)	
211	49	-	-	-	P	I	-	-	-	-	-	-	-	-	Carcinoma lobular	
212	55	-	-	-	P	III	30	-	-	-	-	-	-	-	Carcinoma lobular misto (lobular pleomórfico) T2N1bIIMx	
213	65	14	46	-	P	III	40	D	3	-	N	NEG	POS	NEG (0)	Carcinoma Medular Atípico	
214	53	-	-	-	A	III	23	E	3	-	-	NEG	NEG	POS (3+)	Carcinoma medular de mama	
215	44	-	-	-	P	III	6	-	-	-	-	NEG	-	NEG	Carcinoma Medular residual	
216	52	-	-	-	P	III	15	-	-	-	-	NEG	-	-	Carcinoma Ductal Invasor do tipo medular	
217	52	-	-	-	P	III	30	-	-	-	-	NEG	-	-	Carcinoma Ductal Invasor do tipo medular	
218	68	-	58	-	P	I	30	D	3	-	N	POS	POS	NEG (0)	Carcinoma mucinoso associado à carcinoma ductal invasor	
219	57	-	-	-	A	-	4	E	-	-	-	-	-	-	Carcinoma mucinoso (Carcinoma colóide)	
220	49	-	-	-	-	I	8	-	-	-	-	-	-	-	Carcinoma túbulo ductal bem diferenciado, invasor	
221	48	-	-	-	P	II	8	-	-	-	-	POS	-	-	Carcinoma túbulo-ductal invasor / CDIS micropapilar	
222	53	13	52	20a	A	I	18	E	3	20	-	POS	POS	NEG	Carcinoma túbulo lobular infiltrante	
223	59	17	46	N	A	I	12	D	0	-	S	POS	POS	NEG (1+)	Carcinoma túbulo lobular infiltrativo	
224	50	-	-	-	-	II	9	-	-	-	-	-	-	-	Carcinoma ducto lobular infiltrante	

Código	Idade	Menarca	Menopausa	Pílula	Linfonodos	Grau	Tamanho	Lado	Filhos	IPG	Fuma	RE	RP	HER2	Tipo Histológico	Observações
225	75	16	42	-	A	I	23	-	4	-	N	-	-	-	Carcinoma mamário Papilífero Invasor	
226	55	-	-	-	P	-	68	E	-	-	-	-	-	-	Carcinoma metaplásico / CDIS sólido de grandes células cibriforme e escasso T4bN2Mx	
227	49	-	-	-	P	I	14	-	-	-	-	-	-	-	Carcinoma tubular invasor / CDIS cibriforme escasso	
228	49	-	50	-	A	I	30	E	1	-	-	POS	POS	-	Adenocarcinoma Tubular	
229	65	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	adenocarcinoma	
230	34	-	-	-	P	-	35	-	-	-	-	-	-	-	Adenocarcinoma com áreas mucinosas	

LEGENDA: **Idade** – idade da paciente na época do diagnóstico em anos, **Menarca** – idade da menarca, **Menopausa** – idade da menopausa, **Pílula** – tempo de uso de pílula anticoncepcional, **Linfonodos** – presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares, **P** – presença, **A** – ausência, **grau** – grau histológico dos tumores, **I** – grau I, **II** – grau II, **III** – grau III, **Tamanho** – tamanho do tumor em mm, **Lado** – lado de acometimento da doença, **D** – mama direita, **E** – mama esquerda, **filhos** – número de filhos, **IPG** – idade da primeira gravidez, **Fuma** – fumante ou não fumante, **N** – não, **S** – sim, **RE** – receptor de estrogênio, **RP** – receptor de progesterona, **HER2** – amplificação do oncogene *ERBB2*, **POS** – positivo, **NEG** – negativo, **CDI** – carcinoma ductal invasor, **CDIS** – carcinoma ductal *in situ*.

ANEXO 04 – Tabela com informações sobre os marcadores para cada paciente

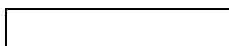
Código	D9S171	D9S1748	D9S169	D9S200	D9S1749
1	Grid	Black	Black	Black	Black
2	Black	Black	Black	Black	Grid
3	Grid	Black	Black	Black	Grid
4	Black	Black	Black	Black	Grid
5	White	Vertical Stripes	Grid	Black	Grid
6	White	White	Grid	Black	Black
7	Grid	Black	Grid	Grid	Vertical Stripes
8	Black	Black	Grid	Black	Grid
9	White	Black	White	Black	Black
10	Black	Black	Black	Black	White
11	White	Black	Black	Black	Black
12	Black	Black	White	Black	Black
13	Grid	Grid	Grid	Black	Grid
14	White	Black	White	Black	Black
15	White	White	Black	Black	Black
16	Grid	Black	Black	Black	White
17	Black	Black	Black	Black	Grid
18	Black	White	Black	Black	Black
19	Black	Black	White	Black	White
20	Grid	Grid	Grid	Black	White
21	Black	Black	Black	White	Grid
22	Black	White	Black	Black	Black
23	Black	Black	Black	White	Black
24	White	Grid	Black	Black	Black
25	White	Black	Black	Black	White
26	Black	Black	White	Black	Black
27	Black	White	Black	White	Black
28	White	Black	Black	Black	Grid
29	Grid	White	Grid	White	Black
30	Black	Black	White	Black	Black
31	Grid	Grid	White	Black	Black
32	Black	Black	White	White	Black
33	Black	White	Black	Black	Black
34	White	Grid	Grid	Grid	Black
35	Black	Black	Black	White	Black
36	Black	Black	White	Black	White
37	Black	White	Black	Black	Grid
38	White	Grid	Black	Vertical Stripes	Black
39	White	Black	Grid	Black	Grid
40	White	Black	Black	Black	Black
41	Grid	Grid	Black	Black	Grid
42	Grid	Black	Grid	Grid	Grid
43	Black	Black	Black	White	Black
44	Black	Black	White	Black	Black
45	White	Black	Grid	Grid	Grid
46	Black	Black	White	Black	Black
47	Black	Black	Black	White	Black
48	White	Grid	White	Black	Grid
49	Grid	Black	Grid	White	Black
50	Black	Black	Grid	Black	Black

51					
52					
53		+++++			+++++
54					
55					
56					
57					
58					
59			+++++		
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67	+++++		+++++	+++++	+++++
68	+++++	+++++	+++++		+++++
69	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
70	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
71	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
72		+++++		+++++	+++++
73	+++++	+++++	+++++		+++++
74	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
75	+++++	+++++		+++++	
76	+++++			+++++	+++++
77	+++++	+++++		+++++	+++++
78	+++++	+++++		+++++	+++++
79	+++++	+++++	+++++		+++++
80		+++++	+++++	+++++	+++++
81	+++++	+++++	+++++		+++++
82		+++++	+++++	+++++	
83	+++++	+++++	+++++		+++++
84	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
85	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
86		+++++	+++++		+++++
87	+++++	+++++	+++++	+++++	
88	+++++	+++++	+++++		+++++
89		+++++	+++++	+++++	+++++
90	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
91	+++++	+++++	+++++		+++++
92		+++++	+++++	+++++	+++++
93		+++++	+++++	+++++	+++++
94	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
95	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
96		+++++	+++++	+++++	+++++
97					
98			+++++		
99					
100		+++++			
101					
102			+++++		
103					

104					
105					
106		+++++			
107	+++++				
108		+++++			
109				■	
110			+++++	+++++	+++++
111					
112	+++++		+++++	+++++	+++++
113		+++++	+++++		+++++
114					
115					
116				+++++	+++++
117				+++++	+++++
118				+++++	+++++
119				+++++	+++++
120					
121					
122					
123			■	■	+++++
124			+++++		
125					
126		■	+++++	+++++	+++++
127		■	■	■	
128				+++++	+++++
129				+++++	+++++
130	+++++		+++++		+++++
131				+++++	+++++
132		+++++			+++++
133	+++++				
134					
135	+++++		+++++		+++++
136	+++++		+++++		+++++
137	■	■	+++++	+++++	+++++
138			+++++		+++++
139					
140					
141	+++++		+++++		+++++
142				+++++	+++++
143		+++++	+++++	+++++	+++++
144					
145		■	■		■
146			+++++	■	+++++
147					
148					
149					+++++
150					
151			+++++		
152	+++++		+++++		+++++
153	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
154					
155					
156					+++++

157					
158					
159					
160					
161					
162					
163					
164					
165					
166					
167					
168					
169					
170					
171					
172					
173					
174					
175					
176					
177					
178					
179					
180					
181					
182					
183					
184					
185					
186					
187					
188					
189					
190					
191					
192					
193					
194					
195					
196					
197					
198					
199					
200					
201					
202					
203					
204					
205					
206					
207					
208					
209					

210					
211					
212					
213					
214					
215					
216					
217					
218					
219					
220					
221					
222					
223					
224					
225					
226					
227					
228					
229					
230					

LEGENDA:**HOMOZIGOTO****LOH****IM****NÃO INFORMATIVO****RETENÇÃO DA HETEROZIGOSE**