

LUCILA GOBBY AMSTALDEN

**ANÁLISE DO COMPLEXO GÊNICO *FANCD2/FANCI* EM
MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE
MAMA HEREDITÁRIO**

CAMPINAS

Unicamp

2011

LUCILA GOBBY AMSTALDEN

**ANÁLISE DO COMPLEXO GÊNICO *FANCD2/FANCI* EM
MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE
MAMA HEREDITÁRIO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR(A): PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CAMPINAS

Unicamp

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso - CRB-8ª / 6652

Am87a Amstalden, Lucila Gobby
Análise do complexo gênico *FANCD2/FANCI* em mulheres
brasileiras com câncer de mama hereditário / Lucila Gobby
Amstalden. - Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Carmen Sílvia Bertuzzo.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mamas - câncer. 2. Fanconi, Anemia de. 3. Metástase.
4. Câncer. 5. Sequência de nucleotídeos. I. Bertuzzo, Carmen
Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: Analysis of the gene complex *FANCD2/FANCI* in Brazilian women with hereditary breast cancer

Keywords: • Breast Cancer
• Fanconi anemia
• Metastasis
• Cancer
• Nucleotides sequence

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profª. Drª. Carmen Sílvia Bertuzzo

Profº. Drº. Mithitaka Soma

Profª. Drª. Marilda de Souza Gonçalves

Profª. Drª. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Profª. Drª. Mônica Barbosa de Melo

Data da defesa: 31.01.2011

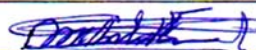
Banca examinadora de Tese de Doutorado

Lucila Gobby Amstalden

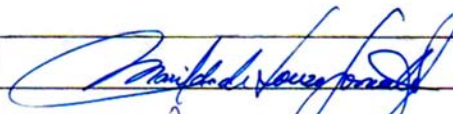
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Mithitaka Soma



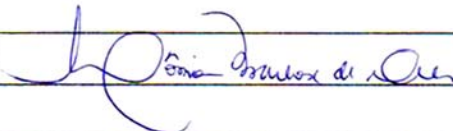
Professor (a) Doutor (a) Marilda de Souza Gonçalves



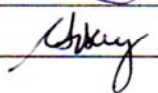
Professor (a) Doutor (a) Vera Lúcia Gil da Silva Lopes



Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo



Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Bertuzzo



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/2011

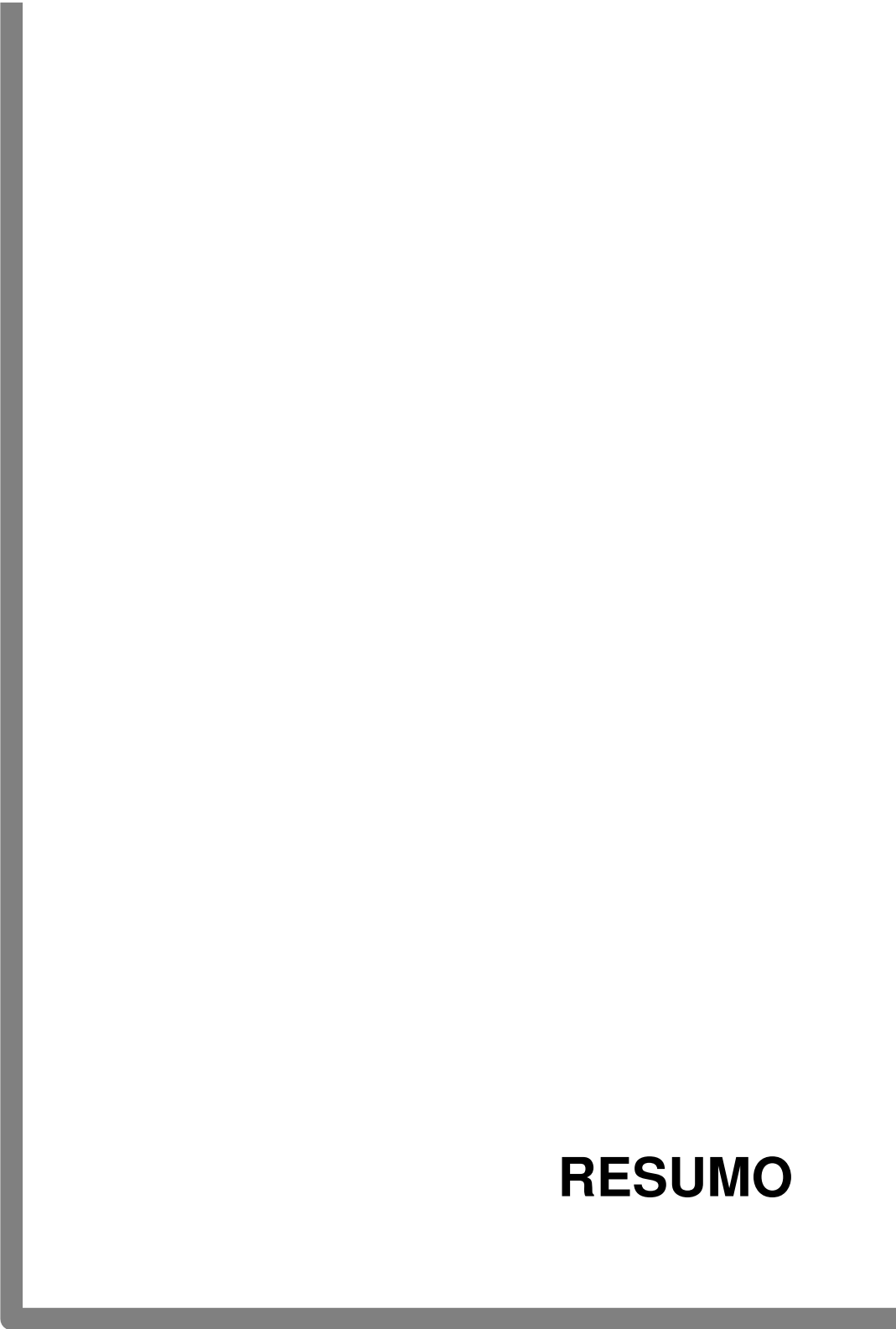
DEDICATÓRIA

À minha querida tia
Maria Beatriz Gobby Bandini (*in memoriam*).

Eternamente amada.

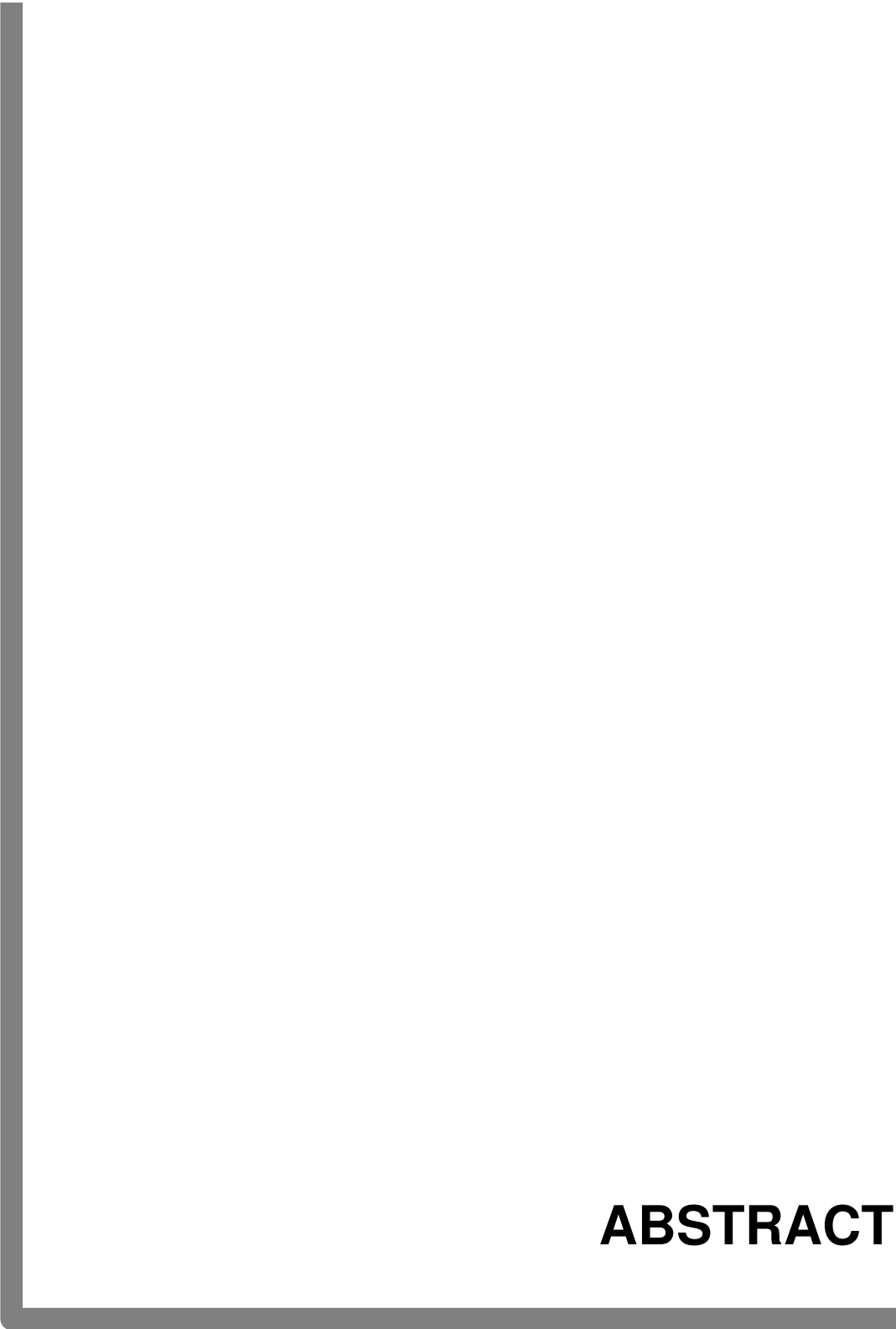
***“A melhor maneira de prever o futuro
é criá-lo”***

PETER DRUCKER



RESUMO

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer que mais comumente ocorre entre mulheres, com a estimativa de 49.240 novos casos diagnosticados em 2010 no Brasil. O CM apresenta fatores de risco conhecidos como idade, fatores sócio-econômicos, etnia, exposição excessiva a hormônios, radiação, dieta, exercícios físicos, história ginecológica e história familiar. Além dos fatores de risco, o CM apresenta fatores de prognóstico mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente. Existem pelo menos 20 subtipos de CM distintos morfológicamente. O complexo formado pelos genes *FANCD2* e *FANCI* tem a função chave de co-localizar o sítio nuclear de reparo para proteínas que diretamente estão relacionadas à recombinação homóloga como BRCA1, juntamente com FANCI, RAD51, BRCA2/FANCD1 com FANCD2. A descoberta de que o gene *BRCA2* é, na verdade, *FANCD1* atraiu pesquisadores para um novo alvo na corrida para a compreensão da história natural da doença, informação esta que permitirá avaliar a hipótese dos genes de reparo de DNA na susceptibilidade ou refratariedade para carcinogênese. O objetivo do atual estudo foi analisar as principais alterações nos genes *FANCD2* e *FANCI* utilizando PCR e digestão enzimática e, paralelamente, rastreamento dos éxons dos genes por meio do sequenciamento automático. A casuística foi formada por 137 mulheres com CM hereditário. Foram encontradas oito alterações em 33 indivíduos e cinco variantes exônicas não relatadas, novas. Por meio de análise estatística, houve a correlação entre indivíduos mutados e dados clínicos. Esse estudo foi de grande valia para a detecção de alterações que podem funcionar como estopim para o desenvolvimento do câncer em indivíduos com CM com histórico familiar sem mutações em genes de alta suscetibilidade, como também servir para caracterizar um tipo histológico distinto auxiliando na terapêutica futura.



ABSTRACT

Breast Cancer (BC) is the cancer type more commonly occurs among women with estimative of 49.240 new cases in 2010. The BC presents risk factors as: age, social-economic factors, ethnicity, hormone exposure, radiation, diet, physical exercises and familiar history. Besides the risk factors BC has prognosis factors measured in diagnostic. There's, at least, 20 subtypes of BC morphologically different. Concerning molecular epidemiology, the BC is associated to many genes and in mutations in various genes as *BRCA1 e 2*, *p53*, *PTEN*. The FANCD2/FANCI complex have a key function of co-localize motif of DNA repair to proteins that directly act on homologue recombination as BRCA1 with FANCI, RAD51, BRCA2/FANCD1 with FANCI. The discovery the *BRCA2* is, actually, *FANCD1* gene has leaded researchers to the new target in knowledge of natural history of disease. The aim of this study was to analyse alterations in *FANCD2* and *FANCI* genes through PCR followed enzymatic restriction. At same time, was performed the screening of the genes exons. The casuistic was constituted from 137 women with hereditary breast cancer. We encountered eight alterations in 25 individuals and 5 exonic variants not reported. This study was very important with the purpose to detect alterations can be responsible by the cancer evolution in BC patients without mutations in high susceptibility genes and to server to characterize a distinct histological types to future therapeutic.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia de Fanconi
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasis Mutated
BC	Breast Cancer
BRCA1	Breast Cancer type 1
BRCA2	Breast Cancer type 2
CDI	Carcinoma Ductal Invasor
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
CI	Carcinoma Inflamatório
CLI	Carcinoma Lobular Invasor
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CM	Câncer de Mama
CME	Carcinoma Medular
CMU	Carcinoma Mucinoso
CP	Carcinoma Papilífero
CT	Carcinoma Tubular
DEB	Diepoxibutano

DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	Doença de Paget
FANCD1	Fanconi anemia, complementation group D1
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I
FANCIJ	Fanconi anemia, complementation group J
FANCN	Fanconi anemia, complementation group N
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
MMC	Mitomicina C
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
TP53	Tumor Protein p53

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Relação entre estádios (linfonodos positivos com tamanho tumoral) e sobrevida no CM.....	50
Tabela 2- Descrição das alterações estudadas, genes, éxons, primers e tamanho do amplificado.....	91
Tabela 3- Enzimas utilizadas na digestão para as diferentes alterações e o tamanho dos fragmentos.....	93
Tabela 4a- Relação das informações clínico-histológicas dos pacientes pertencentes ao estudo. Idades de diagnóstico e atual, utilização de mutagênicos, tabagismo, uso de anticoncepcional ou reposição hormonal. Hachurados em verde estão os indivíduos que apresentaram alterações em um dos genes estudados.....	104
Tabela 4b- Relação das informações dos pacientes pertencentes ao estudo. Antecedente familiar, tipo histológico tumoral, receptor estrógeno, c-erb-2 e resultado molecular. Hachurados em azul estão os indivíduos que apresentaram alterações em um dos genes estudados.....	111
Tabela 4c- Informações dos indivíduos portadores de alterações nos genes estudados.....	119
Tabela 4d- Relação entre indivíduos com e sem mutações e características clínico-histológicas (tabagismo, uso de anticoncepcional, tipo histológico CDI, receptor de estrógeno - e hiperexpressão de HER-2.....	121

	Pág.
Figura 1- Regiões formadoras da mama: vasos linfáticos, ductos, lóbulos.....	53
Figura 2- A- Representação de um corte transversal da mama com seus constituintes. Ducto normal e com CDIS. B- Lâmina histológica da mama com CDIS. Observem que as células não invadem o estroma, a lâmina basal não está sobreposta.....	54
Figura 3- A- Representação de um corte transversal da mama com seus constituintes. Lóbulo normal e com CLIS. B- Lâmina histológica da mama com CLIS. Ácinos distendidos por uma proliferação celular monomorfa, sem atipias e mitoses. Todas as unidades acinares do lóbulo estão comprometidas, mas a lâmina basal não está sobreposta....	56
Figura 4- Lâminas histológicas de uma biópsia de mama de uma paciente com CDI. Estruturas pseudoglandulares, núcleos atípicos e atividade mitótica variável.....	57
Figura 5- Lâmina de biópsia de paciente com Carcinoma Lobular Invasor. Células em “fila indiana”.....	59
Figura 6- Efeitos não genômicos do Receptor de Estrógeno na membrana.....	64
Figura 7- Células tumorais com hiperexpressão da proteína de membrana HER-2.....	66

Figura 8-	Teste de Complementação utilizando células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3). A fusão de P1 com P2 não levou à correção do fenótipo celular (sensibilidade à MMC), portanto são pertencentes ao mesmo grupo de complementação. Já no segundo caso (entre P2 e P3) ocorre a correção, o produto protéico de uma célula substitui o ausente na outra após a formação do híbrido e vice-versa, indicando que os indivíduos são pertencentes a grupos distintos. S - sensível; R - resistente.....	76
Figura 9-	Região em detalhes do gene <i>FANCD2</i> com seus 43 éxons e a localização das principais alterações.....	77
Figura 10-	Região do gene <i>FANCI</i> e a localização das mutações estudadas.....	78
Figura 11-	Vias de atuação dos genes <i>FANCD2</i> e <i>FANCI</i>	80
Figura 12-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras de seis indivíduos. Indivíduos 4 (CM39), 5 (CM58) e 6 (CM71) apresentaram heterozigose para a alteração 376A>G em <i>FANCD2</i> com fragmentos de 105, 145 e 250pb.....	98
Figura 13-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM13), 2 (CM63), 3 (CM55), 4 (CM103) e 5 (CM66) portadores de um alelo com a alteração 1948-6G>A em <i>FANCD2</i> com fragmentos de 103, 171, 190 e 361pb.....	98

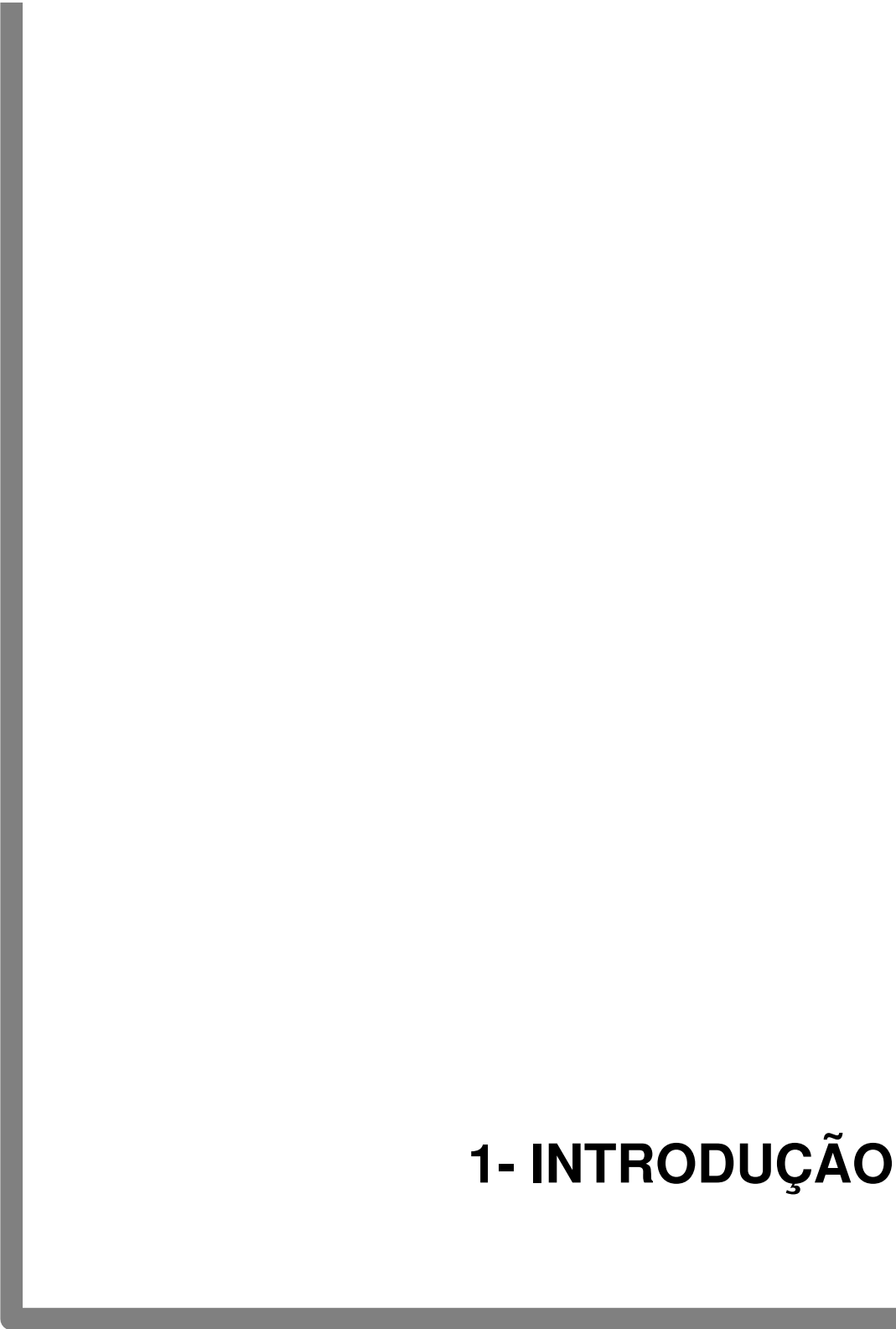
Figura 14-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM78), 2 (CM89), 3 (CM49) e 4 (CM50) portadores de um alelo com a alteração 904C>T em <i>FANCD2</i> com fragmentos de 96, 110, 194 e 290pb.....	99
Figura 15-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM27) e 2 (CM56) portadores de um alelo com a alteração 782A>T em <i>FANCD2</i> com fragmentos de 201, 213, 414pb.....	99
Figura 16-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM29), 2 (CM11), 3 (CM24), 4 (CM19), 5 (CM62) e 6 (CM34) portadores de um alelo com a alteração 866C>T em <i>FANCI</i> com fragmentos de 153, 321 e 474pb.....	100
Figura 17-	Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM17) e 2 (CM22) portadores de um alelo com a alteração 1840C>T em <i>FANCI</i> com fragmentos de 78, 350 e 428pb.....	100
Figura 18-	Gel de poliacrilamida 12% com amostra dos indivíduos 1 (CM 25) e 2 (CM32) portadores de um alelo com a alteração 165C>T em <i>FANCI</i> com fragmentos de 191, 235 e 426pb.....	101
Figura 19-	Gel de poliacrilamida 12% com amostra do indivíduo 1 (CM 112) portador de um alelo com a alteração 3321T>G em <i>FANCI</i> com fragmentos de 167, 275 e 442pb.....	101

Figura 20-	Exemplo de variante exônica: 339 C>T no gene <i>FANCD2</i> do indivíduo CM5. Após a realização do sequenciamento, houve a detecção da troca de uma guanina por uma timina no resíduo 339 (seta preta).....	102
Figura 21-	Representação do gene <i>FANCI</i> com as mutações estudadas (em cinza), as encontradas (em vermelho) e seus éxons (em lilás).....	102
Figura 22-	Representação do gene <i>FANCD2</i> indicando as mutações pesquisadas (em cinza), as mutações encontradas (em azul) e seus éxons (em verde).....	103

	Pág.
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	39
1.1- Câncer.....	41
1.1.1- Protooncogenes e genes supressores.....	43
1.1.2- Câncer Familiar e Hereditário.....	44
1.1.3- Modalidades Terapêuticas.....	44
1.2- Câncer de mama.....	45
1.2.1- Fatores de risco no Câncer de Mama.....	46
1.2.2- Fatores prognósticos no Câncer de Mama.....	48
1.2.2.1- Fator Anatomopatológico: Tamanho Tumoral.....	49
1.2.2.2- Fator Anatomopatológico: Linfonodos axilares.....	49
1.2.2.3- Fator Anatomopatológico: Grau Tumoral.....	51
1.2.2.4- Fator Anatomopatológico: Grau Histológico.....	52
1.2.2.5- Fator Biológico: Receptores Hormonais.....	63
1.2.2.6- Fator Biológico: Proteína c-erbB-2.....	65

1.3- Epidemiologia molecular no CM.....	67
1.3.1- Breast cancer 1 E 2 (BRCA1 e 2).....	68
1.3.2- Phosphatase and tensin (PTEN).....	70
1.3.3- Tumor protein p53 (TP53).....	70
1.3.4- Ataxia telangiectasis mutated (ATM).....	71
1.3.5- CHK2 checkpoint homolog (CHEK2).....	71
1.3.6- Serine threonine kinase (LKB1/STK11).....	73
1.4- Os genes FANCD2 e FANCI e o CM.....	73
1.4.1- AF e o complexo FANCD2/FANCI.....	74
1.5- VIA AF/BRCA.....	78
2- OBJETIVOS.....	83
2.1- Objetivos Gerais.....	85
2.2- Objetivos Específicos.....	85
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	87
3.1- Casuística.....	89
3.1.1- Critérios de Inclusão/Exclusão.....	89
3.1.2- Aspectos Éticos.....	89
3.2- Métodos.....	90
3.2.1- Amplificação Gênica e Digestão Enzimática.....	91
3.2.2- Sequenciamento Automático.....	94

4- RESULTADOS.....	95
5- DISCUSSÃO.....	123
6- CONCLUSÃO.....	129
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8- ANEXOS.....	155



1- INTRODUÇÃO

1.1- Câncer

Câncer é um processo invasivo decorrente da transformação celular envolvendo comprometimento das propriedades de crescimento e diferenciação celular (Parkin et al., 1999; ASCO, 2010).

É um distúrbio genético provocado por mutações em alguns genes que codificam proteínas capazes de estimular o crescimento celular e divisão. O tumor denominado maligno quando suas células têm a capacidade de originar metástases, ou seja, invadir outras células sadias à sua volta, por extensão direta ou por disseminação à distância via sangue, linfa ou superfície serosa. Se essas células chamadas malignas caírem na circulação sanguínea, podem chegar a outras partes do corpo, invadindo outras células sadias e originando novos tumores (Gyton e Hall, 1998; Stites, 2000).

Os tumores chamados benignos não possuem essa capacidade. Eles possuem um crescimento mais lento, não ultrapassando determinado tamanho, além de não se espalharem por outros órgãos. São muito comuns na região das mamas. Inclusive a maioria dos nódulos que aparecem nessa região são tumores benignos, como os cistos e os fibroadenomas, por exemplo. Os cistos são nódulos dolorosos e aumentam antes da menstruação. Os fibroadenomas não se transformam em câncer, e, se necessário, podem ser facilmente retirados através de uma pequena cirurgia, geralmente feita com anestesia local. (Parkin et al., 1999; Kreiger et al., 1999; McPherson et al., 2000).

O comportamento anormal das células cancerosas é geralmente caracterizado por mutações genéticas, expressões de características ontológicas ou secreção anormal de hormônios ou enzimas. Todos os cânceres têm potencial de invasão ou de metastatização, mas cada tipo específico tem características clínicas e biológicas que devem ser estudadas para um adequado diagnóstico, tratamento e acompanhamento (McPherson et al., 2000).

Vários elementos podem causar ou contribuir diretamente para a ocorrência de uma sequência de eventos que levam ao surgimento do câncer. O caminho final dos cânceres é alguma alteração genética que converte uma célula bem constituída, participante do corpo como um todo, em outra que não responde mais aos comandos de uma comunidade de células (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Russo et al., 2000).

Os protooncogenes (oncogenes) e genes supressores de tumores têm papel decisivo em muitos casos. Substâncias químicas (como benzeno e nitrosaminas), agentes físicos (radiação ultravioleta e gama) e agentes biológicos (vírus) contribuem para a carcinogênese em algumas circunstâncias (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

As neoplasias são a terceira maior causa de morte no Brasil, superadas apenas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas causas externas, como a violência. Os motivos que levam ao crescimento da incidência do câncer são: o aumento da expectativa de vida da população em geral e maior exposição a fatores de risco (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

No Brasil os registros estatísticos sobre o câncer são bastante falhos, e não retratam a realidade brasileira. Nos últimos anos há uma tentativa de dar maior confiabilidade aos dados divulgados, e esperamos em breve poder conhecer melhor o que ocorre em nosso país (Parkin et al., 1999; Edwards et al., 2002; Inca, Ministério da Saúde, 2010).

Quando a prevenção do câncer através da mudança de hábitos não é possível, a detecção precoce é a melhor estratégia para reduzir a mortalidade. Campanhas de esclarecimento da população, e também de profissionais da saúde são feitas, nesse sentido, mas no Brasil são muito falhas (Brinton et al., 1988; INCA, Ministério da Saúde, 2010).

1.1.1- Protooncogenes (oncogenes) e genes supressores

Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras, ou seja, que passaram a ter ganho de função ou hiperexpressão. Uma característica importante dos oncogenes é que eles têm efeito dominante na célula, ou seja, um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal para maligna. Esses genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que podem dar início a uma neoplasia (Alberts, 1997).

Por exemplo, o protooncogene *c-sis* codifica o fator de crescimento PDGF. Células que contêm *c-sis* ou então *v-sis* (*c* para celular e *v* para viral) alterados produzem altos níveis de PDGF, que se liga aos receptores de PDGF na superfície das células resultando em uma constante estimulação para proliferação celular. Da mesma maneira, o protooncogene *rás* codifica proteínas que se ligam a GTP. Durante a transdução de sinal a proteína G se liga a GTP que é ativada, sendo desativada pela clivagem de GTP em GDP, resultando no término do sinal estimulatório. Formas mutadas de proteínas codificadas pelo protooncogene *rás* são capazes de se ligar a GTP com eficiência, mas incapazes de quebrar essa molécula. Portanto, células apresentando essa proteína alterada recebem constantemente sinais estimulatórios, resultando em proliferação desordenada (Andersen, 1996).

Além dos protooncogenes outro tipo de gene está envolvido no aparecimento e desenvolvimento de certos tipos de cânceres. Esses genes denominados supressores tumorais, ou antioncogenes, atuam de maneira diferente dos oncogenes. As proteínas codificadas pelos genes supressores estão envolvidas na repressão do crescimento e divisão das células. Portanto, perda ou mutação nos dois alelos de antioncogenes pode levar ao crescimento descontrolado devido à remoção dos mecanismos que regularizam a divisão celular.

1.1.2- Câncer familiar e hereditário

O câncer é chamado familiar quando existe na mesma família vários membros afetados por câncer, com grau de parentesco próximo ou distante e com tumores semelhantes ou não, porém existem diversos fatores ambientais e genéticos envolvidos no aparecimento destes tumores. Já os cânceres hereditários são tipos de neoplasias que afetam mais que um órgão ou sistema, cuja origem está em genes específicos que se transmitem nas famílias (Ellisen e Haber, 1998).

O risco de uma mulher desenvolver, por exemplo, câncer de mama, é aumentado em até três vezes se um parente em primeiro grau já foi afetado e em até dez vezes se mais de um parente em primeiro grau já foi afetado. Esses riscos familiares aumentam ainda mais se o início da doença no parente em primeiro grau afetado tiver sido aos 40 anos de idade ou menos. Diversos estudos em CM são realizados em pacientes com cânceres esporádico, familiar e hereditário na tentativa de identificar fatores que possam caracterizá-los e distingui-los para terapêutica futura eficaz (Lewis, 1997).

1.1.3- Modalidades terapêuticas

As principais modalidades terapêuticas são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia biológica. A cirurgia é a modalidade mais antiga e definitiva quando o tumor é localizado em circunstâncias anatômicas favoráveis. Em geral é o tratamento mais importante, que influencia mais na cura do paciente. Para alguns cânceres, no entanto, a cirurgia não é suficiente devido à disseminação de células cancerosas local ou difusamente. A radioterapia é o mais utilizado para tumores localizados que não podem ser totalmente retirados, ou para tumores que costumam recidivar localmente após cirurgia. Pode causar efeitos colaterais localizados principalmente por lesão de tecidos normais adjacentes ao tumor.

Na quimioterapia, podem ser utilizadas combinações de vários medicamentos diferentes, pois nos tumores há subpopulações de células com sensibilidade diferente às drogas antineoplásicas. Os mecanismos de ação das drogas são diferentes, mas em geral acabam em lesão de DNA celular. A toxicidade contra células normais é a causa da maioria dos efeitos colaterais (náuseas, vômitos, anemia e imunossupressão). Pode ser usada como tratamento principal (leucemias, linfomas, câncer de testículo), mas normalmente é adjuvante após tratamento cirúrgico ou radioterápico, ou paliativo, nas doenças mais avançadas. Na terapia biológica usam-se modificadores da resposta biológica do próprio organismo frente ao câncer “ajudando-o” a combater a doença (linfoquinas, anticorpos monoclonais). Podem-se usar também drogas que melhoram a diferenciação das células tumorais (Crum, 1996).

1.2- Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer que mais comumente ocorre entre mulheres (22% de todos os cânceres) e a segunda causa de morte em mulheres, depois do carcinoma de pele não-melanoma, com a estimativa de 49.240 novos casos diagnosticados em 2010 no Brasil (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Inca, Ministério da Saúde, 2010).

A incidência estimada ao redor do mundo é de aproximadamente um milhão de casos com 200.000 relatados nos Estados Unidos da América (EUA) e 320.000 na Europa (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Tischkowitz, 2008; Vona-Davis e Rose, 2009).

O melhor meio para se diagnosticar o câncer de mama é a mamografia, que é capaz de detectar o tumor antes mesmo que ele se torne palpável. Quando o diagnóstico é feito dessa forma, ainda no início da formação do tumor, as chances de cura se tornam maiores, descartando a necessidade de retirada da mama para o tratamento. Apesar de ser um método eficaz, a mamografia não

descarta o auto-exame e o exame feito pelo ginecologista ou mastologista, já que alguns nódulos, apesar de palpáveis, não são detectados pela mamografia (McPherson et al., 2000; Dumitrescu e Cotarla, 2005).

1.2.1- Fatores de risco no câncer da mama

O câncer de mama, como muitos dos cânceres, apresenta fatores de risco conhecidos. Muitos destes fatores são modificáveis, ou seja, pode-se alterar a exposição que uma pessoa tem a este determinado fator, diminuindo a sua chance de desenvolver este câncer. Existem também os fatores de proteção. Estes são fatores que, se a pessoa está exposta, a sua chance de desenvolver este câncer é menor (Porter, 2009; Anderson, 2010).

Os fatores de risco conhecidos são: idade, fatores sócio-econômicos, etnia, exposição excessiva a hormônios, radiação, dieta, exercícios físicos, história ginecológica e história familiar (Deroo et al., 2010; McTiernan et al., 2010).

O câncer de mama é mais comum em mulheres acima de 50 anos. Quanto maior a idade maior a chance de acometimento por este câncer. Mulheres com menos de 20 anos raramente têm este tipo de câncer (Kono, 2010).

Fatores sócio-econômicos também afetam o risco de câncer de mama, de forma que mulheres de nível sócio-econômico mais elevado apresentam risco maior do que mulheres de nível mais baixo. Além disso, as mulheres que vivem nas cidades têm maior risco do que as que vivem no campo (Mujahid et al., 2010).

A etnia também pode ser um fator que define o risco. Mulheres negras apresentam maior risco de desenvolver câncer na idade inferior a 40 anos, enquanto mulheres brancas têm risco maior de desenvolver câncer de mama em idade igual ou superior a 40 anos (Janz et al., 2009).

Terapia de reposição hormonal (hormônios usados para combater os sintomas da menopausa), que contém os hormônios femininos estrogênio e progesterona, aumenta o risco de câncer de mama. Anticoncepcional oral

administrado por muitos anos também pode aumentar este risco. Retirar os ovários cirurgicamente diminui o risco de desenvolver o câncer de mama porque diminui a produção de estrogênio (EBCTCG, 2005; Chia et al., 2010).

Algumas medicações "bloqueiam" a ação do estrogênio e são usadas em algumas mulheres que têm um risco muito aumentado de desenvolver este tipo de câncer. Usar estas medicações (como o Tamoxifeno[®]) é uma decisão tomada junto com o médico avaliando os riscos e benefícios destas medicações (Rugo, 2008; Untch e Thomssen, 2010).

Faz parte do tratamento de algumas doenças irradiar a região do tórax. Antigamente muitas doenças benignas eram tratadas com irradiação. Hoje, este procedimento é praticamente restrito ao tratamento de tumores. Pessoas que necessitaram irradiar a região do tórax ou das mamas têm um maior risco de desenvolver câncer de mama (Golubicic et al., 2008; Ng e Travis, 2009).

Seguir uma dieta saudável, rica em alimentos de origem vegetal com frutas, verduras e legumes e pobre em gordura animal pode diminuir o risco de ter este tipo de câncer. Apesar dos estudos não serem completamente conclusivos sobre este fator de proteção, aderir a um estilo de vida saudável, que inclui este tipo de alimentação, diminui o risco de muitos cânceres, inclusive o câncer de mama (Pierce et al., 2007; Lof e Weiderpass, 2009).

Exercício físico realizado diariamente diminui a quantidade de hormônio feminino circulante. Como este tipo de tumor está associado a esse hormônio, fazer exercício regularmente diminui o risco de ter câncer de mama, principalmente em mulheres que fazem ou fizeram exercícios quando jovens (Montazeri, 2009; Moros et al., 2010).

Não ter filhos ou engravidar tarde pela primeira vez (após os 35 anos) é fator de risco para o câncer de mama. Menstruar muito cedo (com 11 anos, ou antes) ou parar de menstruar muito tarde expõe a mulher por mais tempo aos hormônios femininos e por isso aumenta o risco deste câncer (Lea et al., 2009).

Concernente à história familiar, mulheres que têm parentes de primeiro grau, mães, irmãs ou filhas, com câncer de mama, principalmente se elas tiveram este câncer antes da menopausa, são grupo de risco para desenvolver este câncer (Frank and Critchfield, 2002; Lu, 2008; Schulman, 2010).

1.2.2- Fatores prognósticos no câncer da mama

Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente (Cianfrocca e Goldstein, 2004; Soerjomataram et al., 2008; Decker et al., 2009).

Em relação ao câncer da mama feminino, novos fatores têm surgido na literatura mundial nos últimos anos. É certo que bons planejamentos terapêuticos podem ser feitos com base no estadiamento pelo TNM (descrição da extensão anatômica da doença), na idade, na condição menopausal e, mais recentemente, na dosagem dos receptores hormonais. A inclusão de novos fatores preditivos certamente proporciona avanços que conduzem a uma seleção ainda melhor dos pacientes principalmente para terapias adjuntas, podendo mesmo chegar a uma individualização da conduta terapêutica. Segundo a última classificação da Organização Mundial da Saúde existem pelo menos 20 subtipos distintos morfollogicamente de câncer de mama (Organização Mundial da saúde, 2010; Hsiao et al., 2010).

Os estudos, na sua grande maioria, analisam um conjunto de fatores em populações sempre diversas, o que prejudica de certa forma uma comparação entre os mesmos. A partir de uma ampla revisão de estudos contemplando os mais importantes fatores prognósticos em câncer de mama, tais como tamanho do tumor, condição dos linfonodos axilares, história familiar, grau histológico, nível sócio-econômico, idade, angiogênese, catepsina D, DNA, p53, micrometástases, receptores hormonais e c-erbB-2, alguns autores objetivam oferecer uma avaliação atual do conhecimento dos mesmos, buscando destacar sua importância na prática clínica diária (McKenzie et al., 2008; Nielsen et al., 2009; Dachs et al., 2010).

1.2.2.1- Fator anatomopatológico: tamanho tumoral

Sabe-se que o risco de recidiva é tanto maior quanto maior for o tamanho do tumor inicial da mama. Assim, tumores considerados muito pequenos (menores que 1cm) são considerados de bom prognóstico. Os tumores grandes (maiores que 5cm) têm grande possibilidade de recidivar. Este dado deve ser analisado em conjunto com os outros fatores prognósticos. De acordo com o tamanho, os tumores são classificados em: T1 (tumor <2cm), T2 (tumor de 2 a 5cm) e T3 (>5cm) (Foulkes et al., 2010).

1.2.2.2- Fator anatomopatológico: linfonodos axilares

A remoção dos gânglios linfáticos da axila é parte da cirurgia no CM. Se estes gânglios apresentarem células tumorais, significa que estas células já se disseminaram a partir do tumor inicial, havendo maior possibilidade de recidiva da doença no organismo. Esta possibilidade é tanto maior quanto maior for o número de gânglios da axila afetados pelo tumor. De acordo com número de gânglios afetados a classificação simplificada ocorre dessa maneira: L1=ausência de metástase, L2=metástases em 1 a 3 linfonodos e L3=metástases em 4 ou mais linfonodos (Tabela 1) (Duraker e Caynak, 2005).

Tabela 1- Relação entre estádios (linfonodos positivos com tamanho tumoral) e sobrevida no CM

Estádio	Taxa de Sobrevida (5 anos)
0	100%
I	98%
IIA	88%
IIB	76%
IIIA	56%
IIIB	49%
IV	16%

Fonte: American Cancer Society, 2010.

Nota: Estádio 0=carcinoma *in situ*; Estádio I=tumor com 2cm e não se dissemina para fora da mama; Estádio IIA=tumor de 2cm e com disseminação para linfonodos axilares; Estádio IIB=tumor de 2 a 5cm com disseminação para linfonodos axilares; Estádio IIIA=sem tumor na mama e encontrado nos linfonodos axilares ou tumor com 5cm com disseminação; Estádio IIIB=tumor com qualquer tamanho e disseminado para linfonodos axilares; Estádio IV=disseminação para outros órgãos.

O Sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença está baseado na avaliação de três componentes: T-a extensão do tumor primário, N-a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M-a ausência ou presença de metástase à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna. Assim temos: T0, T1, T2, T3, T4 | N0, N1, N2, N3 | M0, M1. As seguintes definições gerais são utilizadas (Escobar et al., 2007).

T- Tumor Primário

TX- O tumor primário não pode ser avaliado,

T0- Não há evidência de tumor primário,

Tis- Carcinoma *in situ*,

T1, T2, T3, T4 - Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário.

N- Linfonodos Regionais

NX- Os linfonodos regionais não podem ser avaliados,

N0- Ausência de metástase em linfonodos regionais,

N1, N2, N3- Comprometimento crescente dos linfonodos regionais.

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.

1.2.2.3- Fator anatomopatológico: grau tumoral

O estadiamento tumoral correlaciona-se bem com o prognóstico clínico. Os sistemas de estadiamento mais utilizados para o câncer de mama são a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), a qual foi modificada pelo grupo de Nottingham (Genestie et al., 1998).

O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares ou papilares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. O índice mitótico avalia o número de mitoses

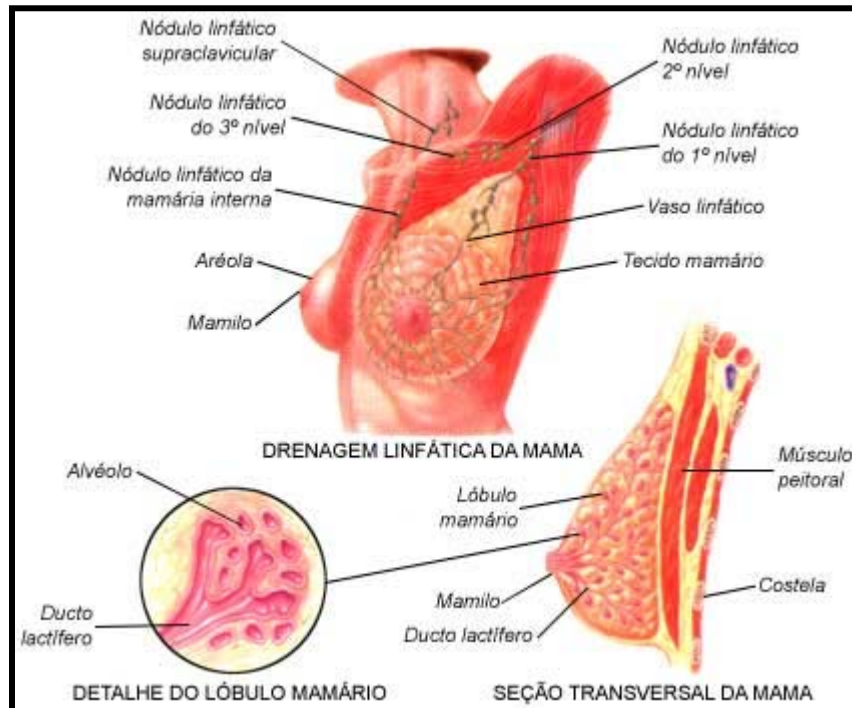
encontradas na amostra do tumor. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (fracamente diferenciado). Pacientes com um escore de SBR de 3 apresentam um risco relativo de 4,4 comparado com aquelas com um escore de SBR de 1 para tempo livre de doença por 5 anos (Meyer et al., 2005; Zhang et al., 2010).

1.2.2.4- Fator anatomopatológico: grau histológico

Aproximadamente 90% de todos os cânceres de mama ocorrem nos ductos ou nos lóbulos, 80% de todos os casos iniciam nas células de revestimento dos ductos mamários (Figura 1). Este tipo de câncer é chamado de Carcinoma Ductal. O câncer que inicia nos lóbulos é chamado de Carcinoma Lobular e é bilateral em 30% dos casos. Se a doença rompe o ducto e atinge os tecidos em volta, é chamado de infiltrativo ou invasor. A doença que está contida dentro dos ductos é chamada de "*in situ*", ou seja, é um processo localizado. A evolução da doença "*in situ*", bem como seu tratamento depende da extensão e localização do processo (Virnig et al., 2010).

Atualmente a maioria dos mastologistas recomenda a ressecção cirúrgica do Carcinoma Ductal *in situ* com margem de segurança seguida de radioterapia localizada para prevenir sua evolução para câncer invasor (Sakorafas et al., 2008).

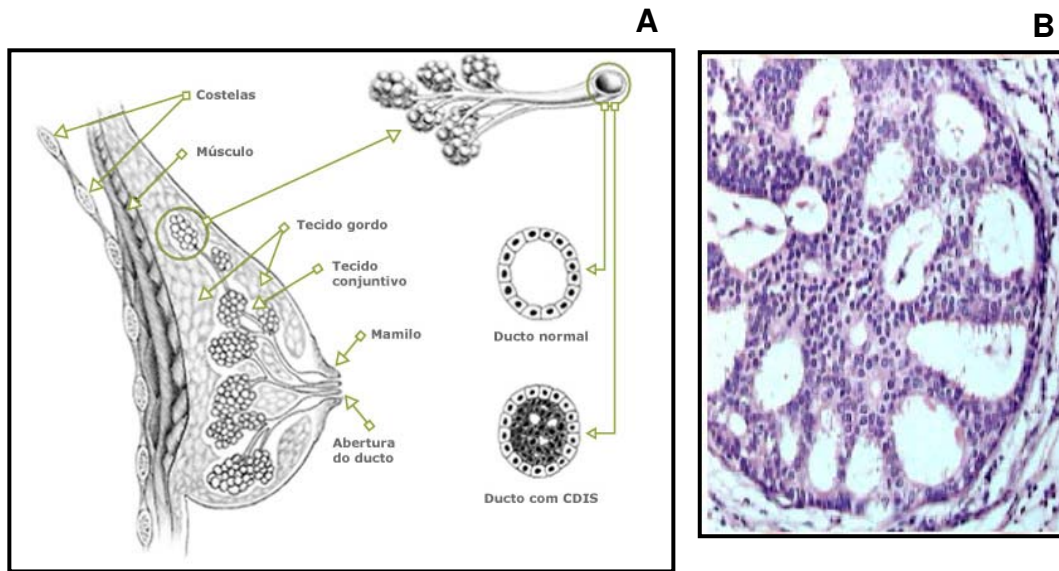
Outros tipos de Câncer de Mama menos frequentes são: tipo medular, mucinoso, tubular e papilar, correspondendo a menos de 10% de todos os casos. A Doença de Paget é um tipo raro de carcinoma *in situ* que se inicia nos ductos do mamilo. As células do CM podem migrar para os vasos sanguíneos, vasos linfáticos e linfonodos. Os linfonodos podem se localizar na região axilar, região supra-clavicular, região cervical e mama interna. Aproximadamente 95% da drenagem linfática da mama se dirige para os linfonodos axilares. Os locais mais comuns de metástases à distância ou disseminação da doença são: a pele, linfonodos, ossos, pulmão e fígado (Figura 1) (Li et al., 2005; Anderson et al., 2006; Albrechtsen et al., 2010).



Fonte: www.breastcancer.org.

Figura 1- Regiões formadoras da mama: vasos linfáticos, ductos, lóbulos

O Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS), ou intraductal, caracteriza-se pela proliferação de células malignas dentro de um ducto, não ultrapassando os limites da membrana basal, não invadindo o estroma, associada a uma hiperchromasia e pleomorfismo nuclear, com alteração da orientação celular do revestimento epitelial. Essas células podem proliferar e obstruir completamente a luz dos ductos, causando sua dilatação e sua solidificação. À medida que a lesão progride, estendendo-se através da membrana basal e invadindo o estroma, transforma-se em um carcinoma invasor (Mokbel e Cutuli, 2006; Patani et al., 2008) (Figura 2).



(Cortesia do Hospital AC Camargo)

Figura 2- A- Representação de um corte transversal da mama com seus constituintes. Ducto normal e com CDIS. **B-** Lâmina histológica da mama com CDIS. Observem que as células não invadem o estroma, a lâmina basal não está sobreposta.

Na década de 80, nos Estados Unidos, o CDIS representava 2% dos cânceres de mama. Atualmente com o uso do rastreamento mamográfico, a incidência dessa patologia aumentou mais de 200% nas mulheres acima de 50 anos, nos últimos 10 anos. Clinicamente, pode se apresentar como uma massa palpável, como derrame papilar ou, mais comumente na atualidade, como alteração mamográfica (microcalcificações e formação nodular não-palpável) (Leonard e Swain, 2004).

O CDIS pode ser dividido, histologicamente, em subtipos: comedocarcinoma, micropapilar, cribriforme e sólido. 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 (Muggerud et al., 2010).

O **Carcinoma Lobular *in situ*** (CLIS) foi primeiramente descrito na década de 40. Sua incidência é baixa, representando em vários estudos 0,5 a 3,6% dos espécimes de biópsias de mama presumivelmente benignos. Não costuma ser palpável em exame clínico e não possui alteração específica em mamografia. A idade média do diagnóstico é de 45 anos, e 80 a 90% dos casos são encontrados em pré-menopáusicas. Essas lesões têm reconhecida tendência à multifocalidade, sendo que a bilateralidade ocorre em aproximadamente 25% dos casos (Lo et al., 2009).

A lesão caracteriza-se pela proliferação de células pequenas e uniformes no interior de ductos terminais e lóbulos, podendo, algumas vezes, estender-se a ductos extra lobulares. Suas células apresentam baixas taxas proliferativas e são semelhantes às encontradas na hiperplasia lobular atípica, porém, nessa, com acometimento menor. Segundo alguns autores, para caracterizar o CLIS, é necessário que pelo menos metade de um lóbulo esteja preenchido por células características (Reis-Filho e Pinder, 2007) (Figura 3).

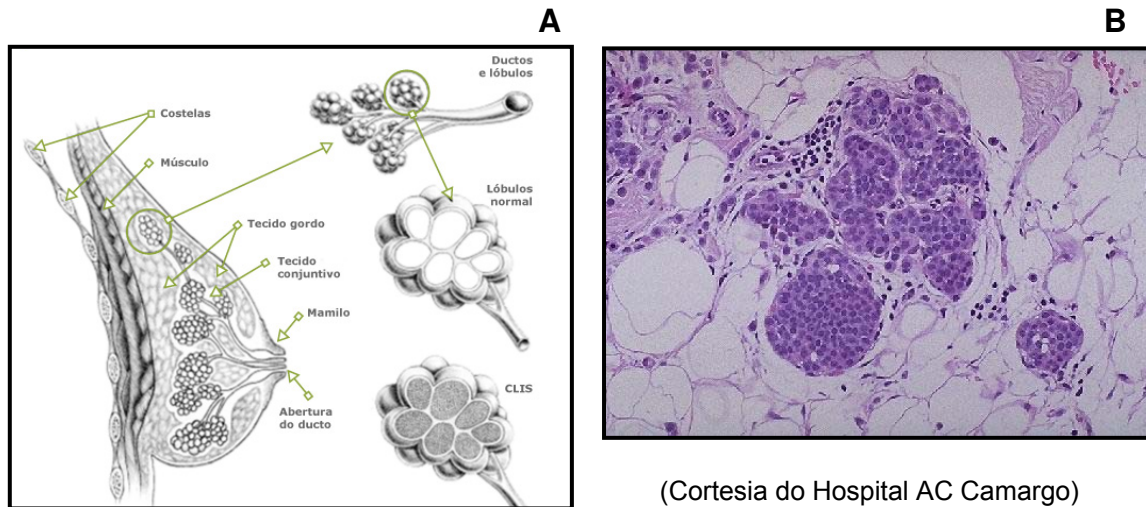
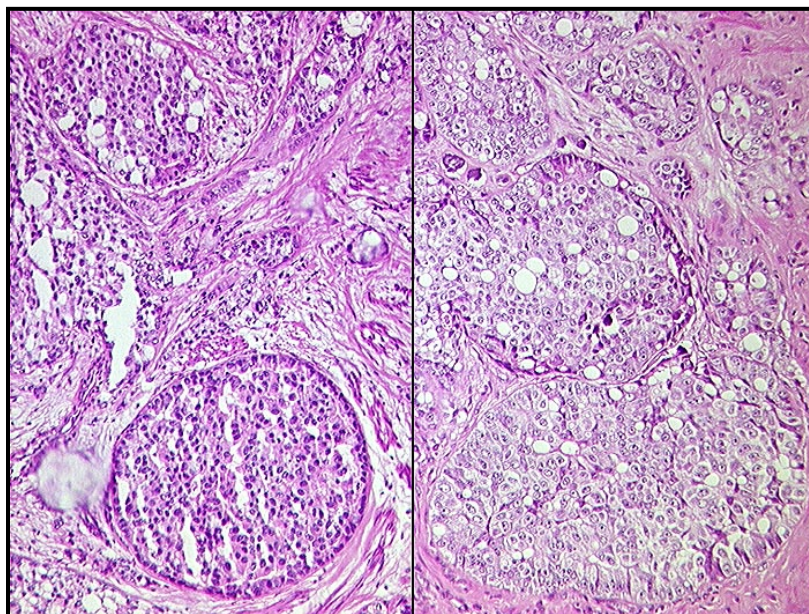


Figura 3- A- Representação de um corte transversal da mama com seus constituintes. Lóbulo normal e com CLIS. **B-** Lâmina histológica da mama com CLIS. Ácinos distendidos por uma proliferação celular monomorfa, sem atipias e mitoses. Todas as unidades acinares do lóbulo estão comprometidas, mas a lâmina basal não está sobreposta

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 (Contreras e Sattar, 2009).

O **Carcinoma Ductal Invasor** (CDI) representa 80% a 90% dos carcinomas da mama. Na verdade seu diagnóstico é por exclusão, feito quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinoma mamário, sendo classificado como carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE). Os carcinomas ductais de tipo especial (medular,

tubular, etc.) compreendem 10 a 20% dos carcinomas invasivos, apresentam melhor prognóstico quando comparados ao CDI-SOE. Para que uma lesão seja classificada como de tipo especial, é necessário que ela seja composta quase que completamente (90% de um tumor) pelas características histológicas do tipo em questão. Quando um carcinoma ductal apresenta apenas pequenos focos de um tipo específico, o tumor continua sendo classificado como CDI-SOE (Cristofanilli, 2009; Mego et al., 2010).



(Cortesia LAPEX/Unicamp)

Figura 4- Lâminas histológicas de uma biópsia de mama de uma paciente com CDI. Estruturas pseudoglandulares, núcleos atípicos e atividade mitótica variável

Macroscopicamente, forma um nódulo sólido ou uma área de condensação no parênquima, de coloração acinzentada ou branquicenta, em geral endurecidos, com consistência de pêra verde ao corte (carcinoma cirroso), o que depende da quantidade de fibrose de estroma, da elastose

peritumoral e da presença de necrose e de calcificações relativamente grosseiras. As lesões podem ser espiculadas ou circunscritas. Aproximadamente um terço dos carcinomas apresenta margens circunscritas (na mamografia ou na macroscopia), e esses costumam ter melhor prognóstico (Riethford e Pantel, 2008).

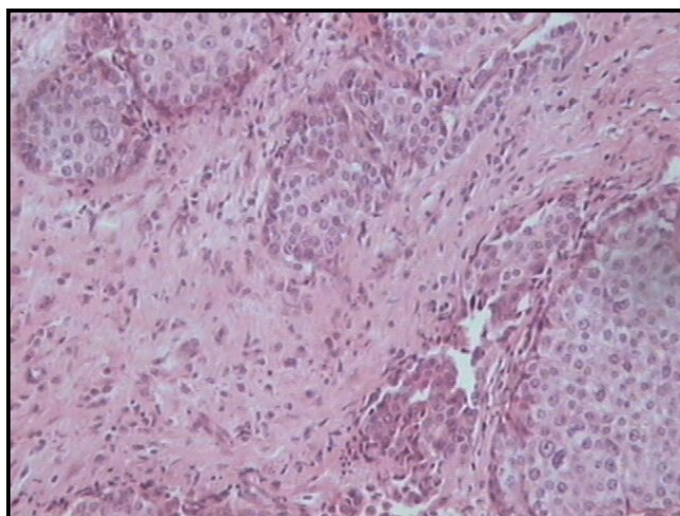
Histologicamente, o tumor é formado pela proliferação de elementos epiteliais com atipias citológicas relativamente acentuadas, com uma tendência diversa a formar estruturas pseudoglandulares ou semelhantes aos ductos, e com atividade mitótica variável. A avaliação histológica destas características (formação de túbulos, atipias nucleares e índice mitótico) serve para graduar o CDI: bem diferenciado (G1), médio grau de diferenciação (G2) e pouco diferenciado (G3) (Schmitt e Lazar, 2010).

As características citológicas variam muito, podendo ser encontradas desde células pequenas com núcleos homogêneos até células grandes com núcleos irregulares e hipercromáticos. Nas margens da massa tumoral, as células neoplásicas infiltram-se para dentro do estroma e do tecido fibroadiposo e, com frequência, há uma invasão dos espaços perivasculares e perineurais, bem como dos vasos sanguíneos e linfáticos (Cristofanilli, 2009) (Figura 4).

O **Carcinoma Lobular Invasor** (CLI) constitui de 10 a 14% dos carcinomas mamários. 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 de pele e fixação. Em geral, as calcificações não estão presentes na lesão, mas podem aparecer em lesões benignas adjacentes. O CLI tende a ser frequentemente multifocal e/ou multicêntrico. A bilateralidade é descrita em 6% a 28% dos casos (Orvieto et al., 2008).

Histologicamente, a lesão caracteriza-se pela presença de células tumorais pequenas e homogêneas, semelhantes ao carcinoma lobular *in situ*, e crescem em "fila indiana" com um padrão concêntrico, circundando os ductos

mamários residuais, com formação de crescimento "em alvo". Algumas vezes, observa-se vacúolos de secreção no citoplasma das células neoplásicas, deslocando o núcleo para a periferia da célula, conferindo à célula um aspecto de células em anel de sinete, sendo, então, classificada como um subtipo de carcinoma lobular invasor, chamado de carcinoma com células em anel de sinete. 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 mais importantes fatores prognósticos (Chivukula et al., 2008; Ansquer et al., 2010) (Figura 5).



(Cortesia LAPEX/Unicamp)

Figura 5- Lâmina de biópsia de paciente com Carcinoma Lobular Invasor. Células em “fila indiana”

O Carcinoma Tubular (CT) representa um dos tipos especiais de carcinoma ductal, muito bem diferenciado, constituindo 2% dos carcinomas da mama. Possui bom prognóstico e, para isso, a lesão deve ser constituída por,

no mínimo, 75% de elementos característicos; caso contrário é considerado carcinoma tubular misto. Incidem em mulheres relativamente jovens, entre 44 e 49 anos (Holland et al., 2001).

Geralmente, apresenta-se como tumor pequeno com média de 0,8cm (em alguns estudos), dificilmente ultrapassando 4cm. O tumor tem consistência firme-endurecida, com coloração branco-acinzentada e aspecto estrelado ao corte. Histologicamente, a lesão é composta por proliferação de túbulos glandulares, de forma irregular, revestidos por uma única fila de células bem diferenciadas, homogêneas, frequentemente apresentando secreção apócrina. O estroma adjacente aos túbulos é abundante, fibrótico e com elastose. Calcificações são encontradas em 50% dos casos, geralmente no componente intraductal, que pode ser visto em 60 a 80% dos tumores. A frequência de acometimento de linfonodos axilares é 9% e, quando ocorre, geralmente não mais do que três linfonodos do nível I são positivos. O prognóstico é extremamente favorável (Zandrino et al., 2006).

O **Carcinoma Medular** (CME) representa até 7% dos carcinomas mamários. Ocorre principalmente em mulheres mais jovens (<35 anos), sobretudo se pertencentes a famílias com alterações genéticas em *BRCA-1* e *BRCA-2* (Racz et al., 2007).

Macroscopicamente, são tumores bem-delimitados, circunscritos, densos com 2 a 3cm de diâmetro, acinzentados, com consistência firme, sendo, muitas vezes, confundidos, no exame físico, com fibroadenomas. Pode ocorrer degeneração cística em tumores maiores. Histologicamente é caracterizado por células pouco diferenciadas, alto índice mitótico, presença de um intenso infiltrado linfoplasmocitário e um padrão sincicial de proliferação (tapete sólido de células). Apesar de suas características histológicas de neoplasia pouco diferenciada e ausência de receptores hormonais, o carcinoma medular é uma neoplasia com prognóstico relativamente favorável (Malyuchik e Riyamova, 2008; Rakha et al., 2009).

O **Carcinoma Mucinoso** (CMU), também conhecido como colóide, mucóide ou gelatinoso, constitui de 1 a 2% dos carcinomas da mama em geral, e representa 7% dos carcinomas em mulheres maiores de 75 anos. Caracteriza-se pela presença de abundante secreção mucinosa 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. Usualmente, o tumor é circunscrito e de aparência mucinosa ao corte. O bom prognóstico é reservado às formas puras de carcinoma mucinoso, sendo muito importante excluir as formas não-puras. Como exemplo disso, aproximadamente 60% dos carcinomas de mama produzem algum grau de mucina, não devendo ser classificados como mucinosos. Também não deve ser confundido com o carcinoma de células em anel de sinete (uma variante do carcinoma lobular invasor), no qual a secreção é intracelular, ao passo que no mucinoso a mucina é extracelular. É considerado um tumor de bom prognóstico (Memis et al., 2000; Fujii et al., 2002; Schwartz et al., 2004).

O **Carcinoma Papilífero** (CP) constitui de 1% a 2% dos carcinomas mamários e caracteriza-se por uma arquitetura papilar do componente invasor e do intraductal. Ocorre mais frequentemente nas mulheres idosas (idade média entre 63 e 67 anos). Sua frequência é de 46%, sendo que 22% a 34% das pacientes apresentam derrame papilar. O tumor é circunscrito, podendo ser lobulado e com um diâmetro médio de 3cm 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. Pode haver dificuldade em distinguir histologicamente alguns papilomas papilíferos intraductais de um papiloma dos ductos. Também é considerado um tumor de prognóstico bom (Neve et al., 2006; Carey, 2010).

Carcinoma Inflamatório (CI) constitui de 1 a 3% dos cânceres de mama, sendo uma de suas formas mais agressivas, cuja apresentação clínica caracteriza-se pelo predomínio dos fenômenos inflamatórios da pele da mama (flogose, eritema, aumento da temperatura local e nítido edema com

espessamento cutâneo). Essa apresentação clínica resulta da embolização tumoral em vasos linfáticos dérmicos. O quadro pode evoluir para lesões ulcerativas (Charafe-Jauffret et al., 2008).

A maioria das pacientes possui um carcinoma invasivo subjacente, geralmente de volume grande e de localização central. De fato, tal carcinoma não representa um tipo histológico, e sim uma entidade clínica. Usualmente, o tipo histológico de origem é o carcinoma ductal invasor e, raramente, um carcinoma lobular invasor ou mucinoso. O tumor do carcinoma inflamatório é classificado com um T4. Histologicamente caracteriza-se por uma invasão dos linfáticos da derme e, às vezes, o diagnóstico clínico não encontra correlação na histologia. O prognóstico dessas lesões é ruim. Com a entrada da quimioterapia neoadjuvante no tratamento do carcinoma inflamatório, a taxa de sobrevida em cinco anos chega até 50% (Bertucci et al., 2010).

A **Doença de Paget** (DP) representa 0,7 a 4% dos cânceres de mama. Caracteriza-se por alteração unilateral do mamilo e/ou da aréola, que pode incluir vesículas areolares recorrentes, eczema eritematoso crônico, lesão psoriática e até uma lesão erosiva. Prurido e aumento da sensibilidade são frequentes. Geralmente, a lesão aparece na papila, estendendo-se à aréola e, raramente, à pele adjacente. Em praticamente todos os casos, é encontrada uma lesão maligna subjacente, sendo o carcinoma intraductal em 65% e o carcinoma ductal invasor em 30% das vezes. Aproximadamente 60% das pacientes com doença de Paget apresentam massa palpável, e as demais, geralmente, apresentam mamografias alteradas (Takahashi e Yamamoto, 2004).

O diagnóstico de Paget é realizado na microscopia em que se identificam células claras grandes com núcleos atípicos, denominadas células de Paget, concentradas na membrana basal da epiderme. A origem dessas células é controversa. A teoria mais aceita é a de que a célula migraria de um tumor intraparenquimatoso através dos ductos até o epitélio papilar. Outra hipótese sugere o inverso: que a célula maligna originar-se-ia da própria epiderme. O estadiamento depende do tamanho da lesão. Quando a lesão está restrita à

papila, sem massa tumoral ou carcinoma invasor associado é classificada como Tis. (classificação TNM). O prognóstico e o tratamento dependem da presença ou não de lesão subjacente (Sakorafas et al., 2001).

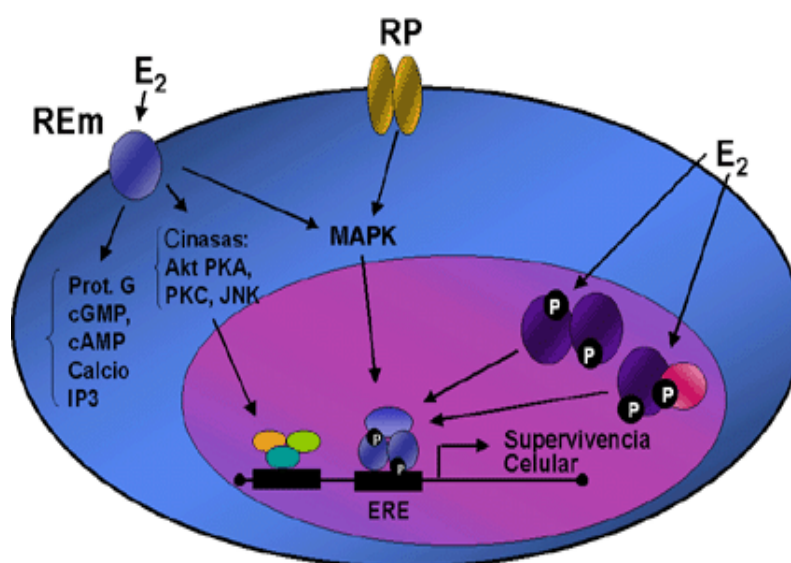
O **Tumor Filóide**, antigamente chamado de cistossarcoma filodes, é uma neoplasia composta por elementos epiteliais e mesenquimais de comportamento bastante variável. Não é muito frequente, representando 2% - 3% dos tumores fibroepiteliais. Apresenta maior frequência entre os 30 e 40 anos de idade (Parker e Harris, 2001; Carey, 2010).

1.2.2.5- Fator biológico: receptores hormonais

Os receptores hormonais, Receptor de Estrógeno (RE) e Receptor de Progesterona (RP) são proteínas presentes ou não nas células tumorais (Figura 6). A presença de uma ou de ambas as proteínas caracteriza o tumor como sendo "receptor positivo". A presença delas mostra que o mecanismo hormonal presente nas células normais da mama está, ao menos parcialmente, preservado nestas pacientes. Isto confere a esses tumores uma menor agressividade. A presença dos receptores possibilita o uso da hormonioterapia nestes casos. O tratamento, a base de hormônios ou anti-hormônios, é bem menos tóxico do que a quimioterapia convencional, e muitas vezes pode ser o único usado nestas mulheres. Já os tumores chamados de "receptores negativos" costumam ter comportamento mais agressivo; a hormonioterapia geralmente não é usada nestes casos e, em geral, a quimioterapia é indicada para o tratamento destas pacientes (Prat e Baselga, 2008; Rastelli e Crispino, 2008; Buzdar, 2009).

O tamoxifeno é uma substância anti-estrogênica não-esteroidal utilizada na terapia adjuvante do câncer de mama. Seu uso foi aprovado em 1978. É a principal terapia endócrina adjuvante em pacientes com câncer de mama e também vem sendo utilizado na prevenção do câncer em pacientes saudáveis sob

alto risco. O tamoxifeno é considerado, primariamente, um antagonista estrogênico. Parece exercer seu efeito através do bloqueio do sítio de ligação do estrogênio no receptor tecidual. Entretanto, dependendo da orientação de sua cadeia lateral, pode apresentar tanto atividade agonista como antagonista - na conformação trans é anti-estrogênico e na conformação cis tem atividade estrogênica predominante. Além disso, seu efeito parece depender do estado do receptor estrogênico, dos níveis de estrogênios circulantes e do tecido alvo (Ellis et al., 2008; Nagar, 2010).



Fonte: <http://wikisenology.wikispaces.com/C%C3%A1ncer+de+mama.+Hormonoterapia>

Figura 6- Efeitos não genômicos do Receptor de Estrógeno na membrana

Nota: O estradiol 17-β (E2) se une a receptores de membrana (REm) e ativa diferentes cascatas de sinais que podem diretamente ou por comunicação cruzada estimular a ativação de mecanismos genômicos. Entre os efeitos mediados por esse receptor estão a ativação de canais de Ca^{2+} , proteínas G, ativação de quinases.

1.2.2.6- Fator biológico: proteína c-erbB-2

A proteína c-erb-B2 é produto de um oncogene (HER-2) que, quando ativado, torna a célula muito susceptível à ação de fatores de crescimento (Figura 7). Sua presença, se detectada na superfície das células tumorais é considerada fator de mau prognóstico. As pacientes que apresentam esta proteína em geral são tratadas com quimioterapia mais agressiva. Por outro lado, as pacientes que expressam esta proteína dispõem de mais um tipo de tratamento para sua doença (Azim e Azim Jr, 2008; Amar et al, 2010).

O Trastuzumab (HERCEPTIN®), um anticorpo monoclonal recombinante contra HER2, tem atividade clínica em câncer de mama avançado que superexpressa c-erb-B2. Um grupo de pesquisadores investigou a eficácia e segurança do trastuzumab após excisão de câncer de mama em estágio inicial e conclusão do tratamento com quimioterapia.

Este estudo randomizado, multicentro, internacional, comparou um ou dois anos de trastuzumab dado a cada três semanas com observação em pacientes com HER2-positivo e câncer de mama com linfonodo positivo ou negativo que tinham concluído a terapia loco-regional e pelo menos quatro ciclos da quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante (Piccart-Gebhart et al., 2005).

Havia dados disponíveis de 1694 mulheres randomicamente designadas para dois anos de tratamento com trastuzumab, 1694 mulheres para um ano de trastuzumab e 1693 mulheres para observação. Neste estudo, foram relatados os resultados somente dos dois últimos casos. Na primeira análise interina planejada (acompanhamento mediano de um ano), 347 eventos (recorrência de câncer de mama, câncer de mama contralateral, doença maligna secundária não de mama ou morte) foram observados: 127 eventos no grupo do trastuzumab e 220 no grupo de observação. A razão de risco não ajustada para um evento no grupo do trastuzumab, em comparação com o grupo de observação, foi de 0,54 (intervalo de confiança de 95%: 0,43 a 0,67; $p < 0,0001$ pelo teste log-rank, cruzando o limite da análise interina), representando um benefício

absoluto em termos de sobrevivência livre de doença em dois anos de 8,4 pontos de porcentagem. A sobrevivência total nos dois grupos não foi significativamente diferente (29 mortes com trastuzumab vs. 37 com observação).

Uma cardiotoxicidade grave se desenvolveu em 0,5% das mulheres que foram tratadas com trastuzumab. Os autores concluíram que um ano de tratamento com trastuzumab após quimioterapia adjuvante melhorou significativamente a sobrevivência livre de doença entre as mulheres com câncer de mama HER2-positivo (Piccart-Gebhart et al., 2005).

Muitos estudos foram realizados para se analisar a eficácia do anticorpo trastuzumab em mulheres HER2-positivo e com neoplasia de mama mais agressiva (Romond et al., 2005; Baselga et al., 2006; Viani et al., 2007; Madarnas et al., 2008; Harbeck et al., 2010).



Fonte: http://examearacatuba.com.br/informativos/boletim1006/cancer_mama.htm.

Figura 7- Células tumorais com hiperexpressão da proteína de membrana HER-2

1.3- Epidemiologia molecular no câncer de mama

Aproximadamente 5 a 10% dos cânceres de mama apresentam um padrão de herança familiar, que nesses casos, se manifesta em idade precoce e é frequentemente bilateral, mas é impossível avaliar com precisão toda a variedade de fatores de suscetibilidade ao câncer que podem ser herdados através dos milhares de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs-single nucleotide polymorphisms) que diferem entre indivíduos. Tais alterações podem ser tão sutis que somente em condições especiais, genéticas ou ambientais, tais suscetibilidades podem ser identificadas (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Edlich et al., 2008; Melchor et al., 2008; Frio et al., 2010).

O câncer de mama familiar está frequentemente associado a outros tumores, como ovário, cólon, próstata, tireóide e tumores linfáticos, estando estatisticamente correlacionado a vários genes ou ainda mutações em vários genes, entre eles *BRCA1* e *2*, *p53*, *PTEN* além de genes de suposta, mas não comprovada função. Estudos sugerem que os genes envolvidos no reparo do DNA e manutenção da integridade do genoma estão implicados na proteção contra as mutações que conduzem ao câncer (Jiricny et al., 2000; Prochaska et al., 2006; Edlich et al., 2008; Banneau et al., 2010).

A hereditariedade exerce um papel fundamental na etiologia do câncer. Uma vez descobertos os genes responsáveis pelas diversas síndromes de câncer hereditário, é possível traçar condutas mais apropriadas tanto do ponto de vista diagnóstico quanto terapêutico para cada paciente, o que pode ser crucial para o seu prognóstico. O aconselhamento genético é fundamental nesses casos, proporcionando medidas adequadas a fim de reduzir a morbi-mortalidade e melhorar a qualidade de vida do paciente em questão (Willard et al., 2005; Campeau et al., 2008; Rogowisk et al., 2009; Scheuner et al., 2010).

A proporção de famílias com mutações nesses genes ainda é desconhecida mas estudos de epidemiologia molecular indicam que 45% dos cânceres de mama familiares são ligados a outros tipos de genes que não os

BRCA1 e 2. Devemos levar em consideração que muitos estudos epidemiológico-moleculares utilizam técnicas que identificam somente mutações específicas e não analisam completamente o gene. Por isso a necessidade de, juntamente com a análise de alterações específicas, a triagem completa do gene (McPherson et al., 2000; Russo et al., 2000; Dumitrescu e Cotarla, 2005).

Além dos genes de alta suscetibilidade, como *BRCA1* e 2, outros genes estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama como *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2*, *LKB1* (Byrnes et al., 2008; Holstege et al., 2009; Nath-Sain et al., 2009; Bakarakos et al., 2010).

1.3.1- Breast cancer 1 e 2 (*BRCA 1* e 2)

O gene *BRCA1*, localizado no cromossomo 17q21, codifica uma proteína nuclear de 220kDa que participa da regulação do ciclo celular das células epiteliais da glândula mamária. O *BRCA1* é considerado um gene supressor tumoral porque mutações nele levam a um defeito no reparo de danos ao DNA e instabilidade genética que favorecem a tumorigênese. As mutações hereditárias no *BRCA1* estão presentes em cerca de 40% dos casos de câncer de mama familiar. Os pacientes com mutação no *BRCA1* apresentam menor tempo de sobrevida livre de doença e maior taxa de mortalidade, assim como maior tendência à bilateralidade. Os carcinomas associados a mutações no *BRCA1* apresentam perfil fenotípico característico. Tipicamente são carcinomas pouco diferenciados, apresentam elevado grau nuclear e alta taxa proliferativa. Além disso, geralmente são negativos para receptores de estrógeno e c-erbB-2, mas positivos para o p53. Embora mutações no *BRCA1* sejam raras nos carcinomas mamários esporádicos, a perda de expressão do RNAm e da proteína codificada pelo *BRCA1* é frequente nos carcinomas não-familiares, provavelmente devido a fatores epigenéticos. A importância prognóstica desses achados, entretanto, ainda não está bem estabelecida (Brody, 1998; Hall, 1990; Li, 1995; Narod, 2005; Bordeleau et al., 2010).

A mutação do *BRCA1* mais estudada é a 185delAG, comum em mulheres Askenazi. Tal mutação parece ter sido originada há 600 anos e transmitida, através do “efeito fundador” à grande parte da população de judeus Askenazi. Desta forma, esta mutação é observada em 29-45% dos cânceres de ovário em uma população Askenazi de Israel. As 3 principais mutações do câncer de mama (185delAG, 5382insC no *BRCA1* e 6174delT no *BRCA2*) juntas são responsáveis por cerca de 1/4 dos cânceres familiares de mama. O *BRCA1* é extremamente longo, contendo mais de 100.000pb de DNA genômico e 23 éxons, o que dificulta enormemente a detecção de mutações no diagnóstico dos casos familiares. Associado a esta dificuldade, mais de 100 mutações já foram descritas e este número continua a se expandir, à medida que novos trabalhos são publicados (Narod, 1991; Privat et al., 2009).

O *BRCA2* também é longo, cerca de 70.000pb de DNA genômico e as dificuldades de sequenciamento são semelhantes (Wooster, 1994; Brody, 1998).

Estudo de Howlett et al. (2002) demonstrou ser o gene *FANCD1* o próprio gene *BRCA2*. O gene *FANCD1* é um dos treze genes relacionados ao distúrbio genético denominado Anemia de Fanconi, relatado a seguir. A sequência do *BRCA2* foi determinada em um paciente pertencente ao grupo D1 de complementação e mostrou a presença de duas mutações truncadas. O interessante é que homozigotos do gene *BRCA2* nunca foram descritos, uma vez que acreditava-se que esta combinação fosse letal. A confirmação de que o *FANCD1* é realmente o *BRCA2* foi realizada pela análise de complementação das células *FANCD1* com cDNA do gene *BRCA2*. O gene, de 27 éxons, está localizado em 13q12-13 e produz uma proteína de 384kD. (Meetei et al., 2003; Rodríguez, 2003; Stewart e Elledge, 2002; van der Heijden et al., 2003; Wang e D'andrea, 2004).

O risco de um portador de mutações nos genes *BRCA2/FANCD1* desenvolver câncer depende da penetrância da mutação específica da família analisada mas está estimado em cerca de 67 a 90% durante toda a vida com idade média de 45 anos. Algumas mutações de baixa penetrância apresentam histórias familiares mínimas (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

1.3.2- Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*)

O gene *PTEN* é um supressor de tumor, localizado no cromossomo 10q22-23. Codifica uma fosfatase citoplasmática que defosforila o segundo mensageiro PIP3, inibindo a proteína-quinase AKT, responsável pela transdução de sinais de sobrevivência e proliferação celular e inibição de apoptose (Ellisen e Haber, 1998). Foram observadas mutações somáticas ou perda de heterozigose (LOH) em tumores esporádicos, como câncer de mama. Na síndrome de Cowden, as mutações são detectadas entre 13% e 80% dos casos. As mutações podem ser pontuais, inserções e deleções. O “hot spot” está no éxon cinco, que codifica o centro ativo da enzima fosfatase. Não foi determinada relação fenótipo-genótipo até o momento. O gene *PTEN* também está mutado em pacientes com a síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRR) (Dumitrescu e Cotarla, 2005; Chacko et al., 2005; Banneau et al., 2010).

1.3.3- Tumor protein *P53* (*TP53*)

O gene supressor de tumor *TP53* situa-se no braço curto do cromossomo 17, na posição 13.1. O produto do gene é uma fosfoproteína nuclear de 53kDa com capacidade de se ligar especificamente ao DNA e ativar a transcrição. Os mecanismos moleculares segundo os quais a p53 funciona normalmente e como estes mecanismos são alterados durante a tumorigênese ainda não são completamente compreendidos. Nos últimos anos, várias evidências experimentais têm demonstrado que a proteína p53 selvagem pode regular negativamente a proliferação celular. Um dos genes induzidos pela p53 é o p21/WAF1, um inibidor de CDKs. A p53 normal pode induzir p21, que inibe cdk4, resultando em defosforilação do Rb e, conseqüentemente, inibição do ciclo celular. Em resposta a danos no DNA a p53 leva a uma interrupção temporária do ciclo celular na fase de transição de G1 para S, permitindo à célula reparar a integridade de seu genoma. Quando os danos no DNA são irreversíveis e não podem ser reparados, a p53 induz a célula a entrar em apoptose (Ellisen e Haber, 1998; Dumitrescu e Cotarla, 2005; Shirley et al., 2009).

1.3.4- Ataxia telangiectasis mutated (**ATM**)

O gene *ATM* é um gene supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3). A proteína ATM tem função de quinase e interage com as proteínas de progressão do ciclo celular BRCA1, p53, CHEK2, com as proteínas de checagem RAD17, RAD9 e a proteína de reparo do DNA NBS1. O gene *ATM* é expresso como resposta após o dano ao DNA causado por radiação ionizante, com a função de interrupção do ciclo celular. A proteína-quinase ATM, junto com a proteína-quinase ATR, é tida como um dos principais controladores dos caminhos de sinalização do ciclo celular necessários para o reparo do DNA e para a estabilidade do genoma. Vários estudos demonstram a associação entre a mutação de uma das cópias do gene *ATM* e câncer de mama. A ataxia-telangiectasia é causada pela mutação das duas cópias do gene ATM. Nessa condição, ocorre degeneração do cerebelo, por morte aumentada e inadequada das células de Purkinje, e atelectasias cutâneas (Johnson et al., 2007; Walsh e King, 2007; Turnbull e Rahman, 2008; Wang et al., 2010).

1.3.5- *CHK2* checkpoint homolog (S. pombe) (*CHEK2*)

O gene *CHEK2* está localizado no braço longo no cromossomo 22 na posição 12.1. *Cell-cycle-checkpoint kinase 2 (CHEK2)*, anteriormente denominado *CHK2*, é um homólogo humano do Cd1e Rad53 da levedura, e é um dos mediadores da resposta ao dano do DNA. *CHEK2* é parte da via do *p53*, e modula a função do *p53* através da fosforilação em resposta do dano do DNA, levando a parada do ciclo em G1. *CHEK2* também regula a função da proteína BRCA1 após o dano no DNA. A proteína CHEK2 é ativada através da fosforilação via ATM em resposta a quebras na dupla-fita do DNA. Assim, *CHEK2* é um componente de uma rede que controla o ciclo celular e o reparo do DNA. Mutações germinativas no *CHEK2* estão associadas a síndromes hereditárias de predisposição ao câncer, e também foram observadas mutações somáticas em diversos tumores,

tais como pulmão, ovário, sarcomas, linfomas, e também na síndrome mielodisplásica (Vahteristo et al., 2002; Bell et al., 2007; Weischer et al., 2008; Gronwald et al., 2009).

Estudos demonstraram que uma variante protéica truncada, 1100delC, está associada a um maior risco de câncer. Meijers-Heijboer et al. (2002) identificaram a variante *CHEK2* 1100delC em 5,1% dos indivíduos com câncer de mama de 718 famílias sem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estes autores estimaram que a mutação *CHEK2* 1100delC levava a um aumento de duas vezes no risco de câncer de mama.

Para verificar a associação entre a mutação *CHEK2* 1100delC e câncer de mama, o *CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium* (2004) avaliou 10 estudos caso-controle, que incluíram aproximadamente 11.000 casos e 9.000 controles. A prevalência geral da mutação entre os controles foi 0,71%, mas foram observadas variações substanciais. A frequência mais elevada foi observada em estudos finlandeses (1,3%) e a frequência mais baixa foi encontrada em estudos australianos (0,14%). A prevalência da mutação entre os casos variou entre 0,68% (estudo australiano) e 3,8% (estudo holandês). A odds ratio (OR) geral foi 2,34 (IC 95% 1,72-3,20). Em todos os 10 estudos, a OR estimada foi superior a um, ainda que o excesso de risco tenha sido significativo apenas no estudo ABC e no PROSPECT (Meijers-Heijboer, 2002).

A OR associada com a *CHEK2* 1100delC foi 7,91 para casos diagnosticados antes dos 30 anos; 2,65 no grupo com câncer diagnosticado entre 30 e 39 anos; 2,80 no grupo com diagnóstico entre 40 e 49 anos; 2,13 no grupo com diagnóstico entre 50 e 59 anos; 1,95 no grupo entre 60 e 69 anos; e 1,82 no grupo com diagnóstico aos 70 anos ou mais. Assim, do total de casos de câncer de mama genotipados para *CHEK2* 1100delC, 67 eram portadoras de mutações no *BRCA1*, e 63 eram portadores de mutação em *BRCA2*. Nenhuma das portadoras de mutação nestes genes eram portadoras de mutação no *CHEK2* 1100delC.

1.3.6- Serine threonine kinase 11 (*STK11*/*LKB1*)

LKB1 (também conhecido como *STK11*) é um gene supressor de tumor identificado recentemente cuja mutação pode levar à Síndrome de Peutz-Jeghers, que se caracteriza por pólipos gastrointestinais e câncer de diversos sistemas orgânicos. Aproximadamente 30% das amostras de câncer de mama esporádico expressam baixos níveis de *LKB1*. Isto sugere que o gene *LKB1* pode estar relacionada à tumorigênese do câncer de mama (Shaw, 2009).

Um estudo reintroduziu *LKB1* em MDA-MB-435 células cancerosas da mama que não expressam o gene *LKB1* para investigar como a superexpressão de *LKB1* afeta a invasão tumoral e metástase. A superexpressão da proteína *LKB1* nas células do câncer de mama resultou em significativa inibição da invasão *in vitro*. *In vivo*, a expressão de *LKB1* está relacionada ao crescimento reduzido do tumor na gordura mamária, densidade microvascular e metástase pulmonar. A superexpressão *LKB1* foi associada com baixa-regulação da metaloproteinase de matriz-2, metaloproteinase-9, do fator de crescimento endotelial vascular e fibroblasto básico mRNA do fator de crescimento e níveis de proteína. A superexpressão da proteína *LKB1* no câncer de mama humano está significativamente associada com diminuição da densidade de microvasos. Esses resultados indicam que *LKB1* desempenha um papel regulador negativo no câncer de mama humano, uma descoberta que pode levar a uma nova estratégia terapêutica (Fenton et al., 2006; Taliaferro-Smith et al., 2009; Saxena e Sharma, 2010).

1.4- Os genes *FANCD2* E *FANCI* e o câncer de mama

A descoberta de que o gene *BRCA2* era o gene alterado em indivíduos pertencentes ao grupo de complementação FA-D1 e a identificação dos genes *BRIP1* (*BRCA1* Interacting Protein) e *PALB2* (Partner and Localizer of *BRCA2*) como os genes dos grupos de complementação FA-J e FA-N respectivamente, estabeleceu uma ligação entre câncer de mama e Anemia de Fanconi (Zdzienicka et al., 2002; Chen et al., 2008; de Nicolo et al., 2008; Ameziane et al., 2009).

Estudos avaliaram o risco para CM em mulheres heterozigotas para alterações em *FANCI* e *FANCD2* e relataram um aumento de 2% no risco de desenvolvimento dessa neoplasia em indivíduos *BRCA1* e *2* negativos (Seal et al., 2003; Rahman et al., 2007).

Pesquisas baseadas na observação de camundongos Knockout para *FANCD2* e *FANCI* sugerem que mutações nesses genes desempenham um importante papel no desenvolvimento do câncer de mama (Seal et al., 2003; Lewis et al., 2005; Barroso et al., 2006; Parmar et al., 2009).

Poucas foram as pesquisas realizadas na análise do complexo gênico *FANCD2* e *FANCI*.

1.4.1- Anemia de Fanconi (AF) e o complexo *FANCD2/FANCI*

A AF foi descrita pela primeira vez em 1927. Desde então, mais de 1300 casos foram relatados (Fanconi, 1927; Alter, 1996; Wang e D'Andrea, 2004).

A AF é caracterizada por múltiplas anomalias congênitas, progressiva falha da medula óssea e alto risco para desenvolvimento de câncer (Wang e D'Andrea, 2004).

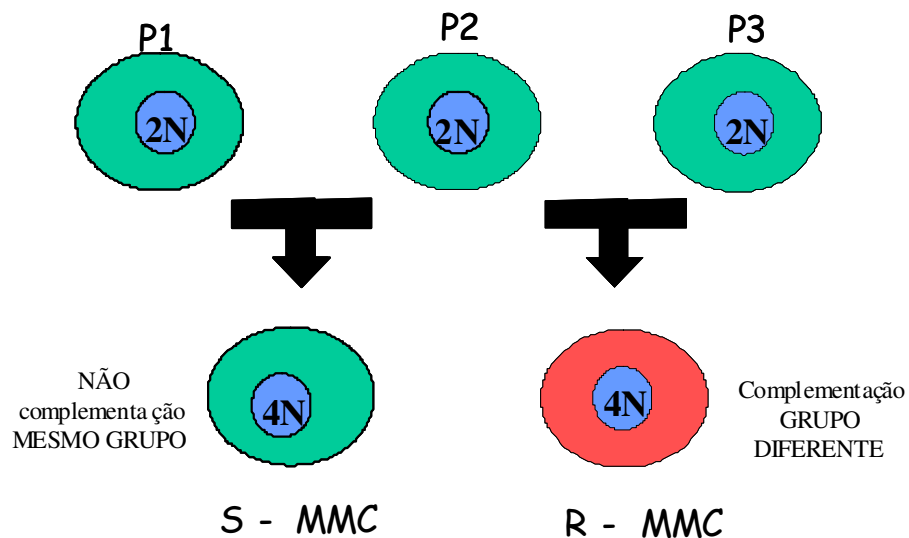
A doença é denominada também de Síndrome da Instabilidade Cromossômica. As células de pacientes com AF são caracterizadas por hipersensibilidade para quebras cromossômicas por agentes clastogênicos como, por exemplo, Mitomicina C (MMC), Diepoxibutano (DEB), cisplatina e ciclofosfamida (Auerbach, 2003; Esmer et al., 2004).

Estas quebras cromossômicas, descritas por Schroeder et al. (1964), são visíveis microscopicamente através da análise citogenética de metáfases, tornando, esta característica, base para um teste diagnóstico eficaz. Este espontâneo dano do cromossomo é causado devido à perda ou demora na fase S ou G2 do ciclo celular.

A mais importante das características clínicas na AF é a hematológica; a incidência de anemia aplástica (falta de todos os tipos celulares do sangue), da Síndrome Mielodisplásica (MDS) e da Leucemia Mielóide Aguda (AML) é alta em homozigotos. Para aqueles pacientes que alcançarem a idade adulta, existe um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente tumores hepáticos, e carcinomas de células escamosas de esôfago, orofaríngeo e da vulva. Há três mecanismos que podem predispor os pacientes com AF ao desenvolvimento de neoplasias: o defeito no reparo do DNA, o defeito na detoxificação de radicais de oxigênio e a imunodeficiência (Auerbach e Allen, 1991; Butturini et al., 1994; Alter, 1996; García et al., 2008; Auerbach, 2009).

A expectativa de vida dos pacientes é reduzida para, em média, 24 anos. As principais causas da morbidade e mortalidade são a anemia aplástica, mielodisplasia, Leucemia Mielóide Aguda e tumores sólidos em idade mais avançada, desde que o paciente consiga sobreviver às malignidades hematológicas da infância. Os portadores heterozigotos são assintomáticos (Kutler et al., 2003).

Foram relatados, até recentemente, 13 grupos de complementação, determinados por hibridação de células somáticas (Figura 8). São eles: FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M e N e treze genes foram descobertos (van der Heijden et al., 2003; Wang e D'Andrea, 2004).

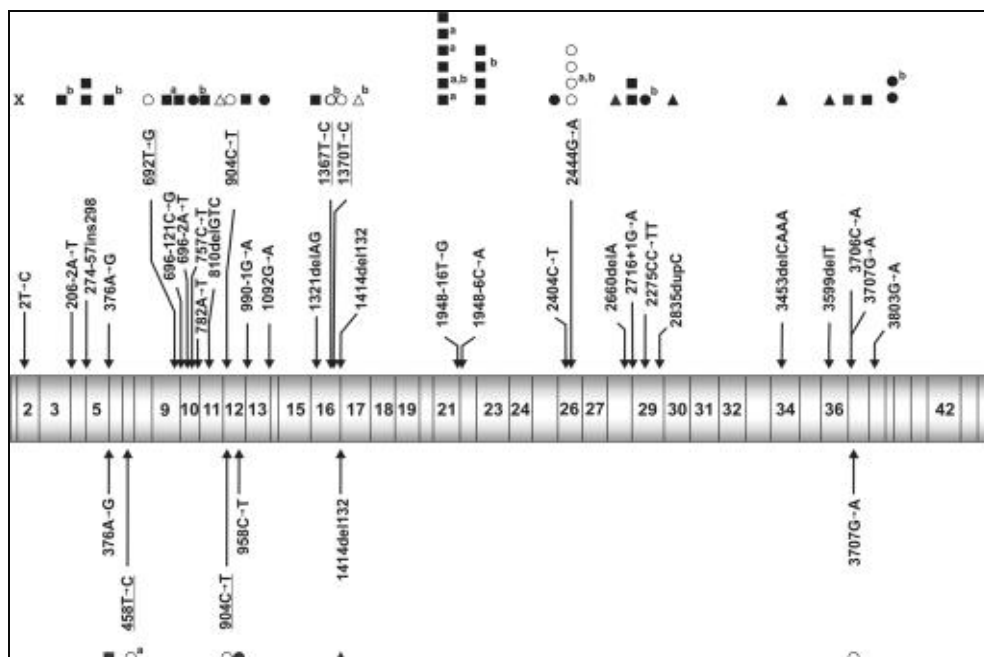


Fonte: Adaptado de Joenje e Patel (2001)

Figura 8- Teste de Complementação utilizando células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3). A fusão de P1 com P2 não levou à correção do fenótipo celular (sensibilidade à MMC), portanto são pertencentes ao mesmo grupo de complementação. Já no segundo caso (entre P2 e P3) ocorre a correção, o produto protéico de uma célula substitui o ausente na outra após a formação do híbrido e vice-versa, indicando que os indivíduos são pertencentes a grupos distintos. S-sensível; R-resistente

O gene *FANCD2* foi mapeado por Hejna et al. (2000) e clonado por Timmers et al. (2001) e apresenta um papel chave na função do complexo da AF no reparo de DNA. Shimamura et al. (2002) desenvolveram um método complementar para o diagnóstico da AF, baseado na detecção da forma monoubiquitinada da proteína *FANCD2*. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 3 região 25.3. Apresenta 44 éxons (The Rockefeller University-NY, 2010).

Seal et al. (2003) analisaram 88 indivíduos sem mutações em BRCA1 e 2 para mutações em genes relacionados à AF. Encontraram 69 alterações no total e uma mutação de sentido trocado em *FANCD2*. Em outro estudo, Lewis et al. (2005) identificaram seis variantes exônicas (Figura 9).



Fonte: Kalb et al., 2007

Figura 9- Região em detalhes do gene *FANCD2* com seus 43 éxons e a localização das principais alterações

Os grupos de complementação FA-I e FA-J foram descritos por Levitus et al. (2004). Nesse estudo, oito pacientes AF não consanguíneos foram excluídos dos subtipos já conhecidos com base em ensaios de complementação. Linhagens celulares de quatro desses oito pacientes não mostraram complementaridade entre si, constituindo um novo grupo designado FA-I. As outras quatro linhagens complementaram esse grupo, mas não complementaram umas às outras levando à identificação de um segundo novo grupo de complementação denominado FA-J (Dorsman et al., 2007).

Em estudos adicionais ambas as linhagens foram capazes de estabelecer a formação do complexo principal de proteínas AF; porém, em células FA-I, a proteína FANCD2 não pode ser monoubiquitinada, indicando um defeito à montante na via AF/BRCA. Até este momento era possível presumir que a FANCI exercia suas funções na monoubiquitinação da FANCD2 de

forma indireta, possivelmente a jusante da FANCL e a montante da FANCD2 (Levitus et al., 2004; Godthelp et al., 2006; Yuan et al., 2009).

Em 2007, Smogorzewska et al. identificaram o gene *FANCI* que está mutado em linhagens de células do grupo FA-I. A região codificadora do gene *FANCI* foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA de linfócitos humanos e corresponde a uma variante do gene *KIAA1794* localizado no cromossomo 15q25-26 (Figura 10).

A proteína correspondente tem 1328 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 150kDa. Estes autores identificaram ainda que o gene *FANCI* (*KIAA1794*) apresenta regiões homólogas com o gene *FANCD2* e que seu produto também é monoubiquitinado. A FANCI liga-se a FANCD2 e ambas as proteínas ubiquitinadas formam um complexo a jusante na via de interação AF/BRCA, necessário para que ocorra o reparo de ligações cruzadas do DNA, especialmente por recombinação homóloga. Estes achados são bastante recentes e requerem mais estudos para a completa elucidação (Smogorzewska et al., 2007).

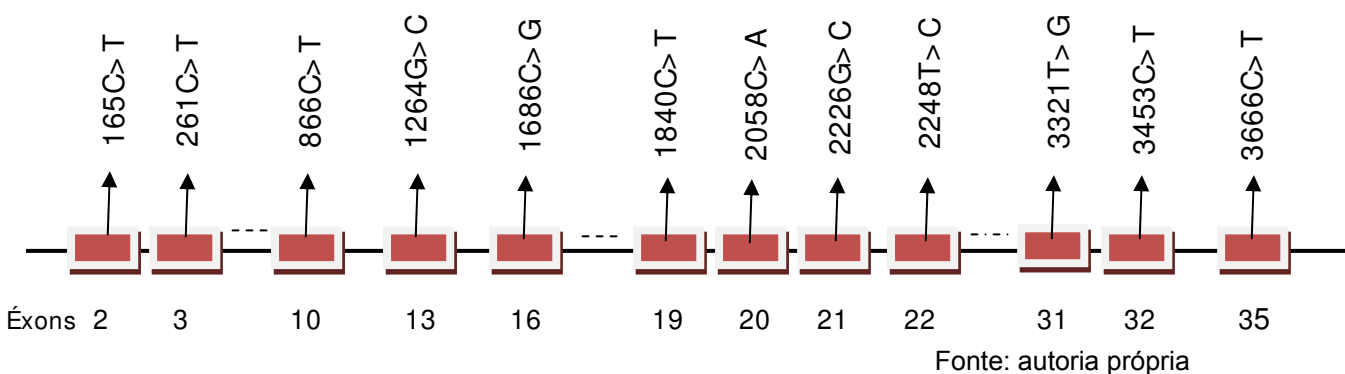


Figura 10- Região do gene *FANCI* e a localização das mutações estudadas

1.5- Via AF/BRCA

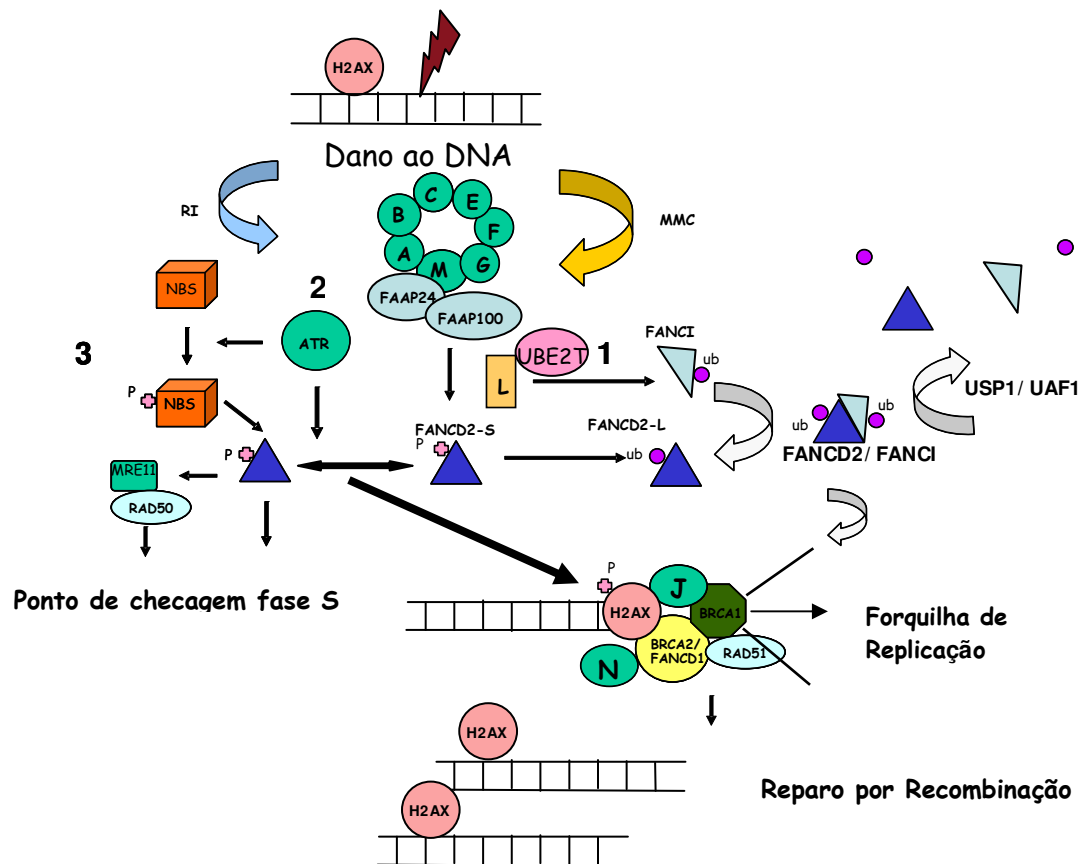
A proteína FANCD2, codificada pelo gene de mesmo nome, está presente em três vias: na primeira delas, o complexo nuclear, formado pelas proteínas FANCA, B, C, E, F, G, M, juntamente com FANCL, provoca a conversão

de FANCD2S (produto primário da tradução) em FANCD2L (forma monoubiquitada). Essa, por sua vez, ativa as proteínas que diretamente atuam no reparo de DNA por recombinação homóloga. São elas: BRCA1, com FANCD1, BRCA2/FANCD2 e RAD51. Na segunda via, a proteína FANCD2 interage independentemente com ATM/ATR. Mutações na proteína ATM, codificada pelo gene Ataxia Telangiectasia Mutated, causa o distúrbio autossômico recessivo denominado Ataxia Telangiectasia que, como na AF resulta em quebras cromossômicas espontâneas e cânceres hematológicos. Diferentemente da AF, os pacientes AT apresentam imunodeficiência e degeneração neural cerebelar. A proteína ATM é responsável pela fosforilação de FANCD2S, a qual atua diretamente no ponto de checagem na fase S do ciclo celular. Na terceira e última via, a proteína ATM, ativada em resposta ao dano do DNA induzido por radiação ionizante, ativa a proteína NBS responsável pela fosforilação de FANCD2S, a qual atua sobre o complexo MRE11 e RAD50, proteínas responsáveis pelo ponto de checagem na fase S do ciclo celular (Figura 11) (Couzin, 2003; D'Andrea e Grompe, 2003; Meetei et al., 2004; Nakanish et al., 2002; Taniguch et al., 2002; Wang e D'Andrea, 2004; Zhang et al., 2004; Taniguch e D'Andrea, 2002; Liu et al., 2010).

Mutações nos genes *FANCD2* e *FANCD1* alteram a função do produto protéico e levam à interrupção da via responsável pelo reparo de DNA por recombinação, pela não ativação das proteínas BRCA1 e BRCA2. Assim, com a função das proteínas desses genes comprometida não há a regulação do ciclo celular das células epiteliais das glândulas mamárias, evento que pode desencadear o CM (Taniguch e D'Andrea, 2002; D'Andrea, 2010).

Cada vez mais fica definida a importância dos mecanismos genéticos no CM e sua grande complexidade. Em virtude, da alta incidência do câncer em mulheres, da alta taxa de mortalidade, da grande quantidade de genes envolvidos na etiologia do distúrbio e do alto risco para desenvolvimento do câncer em indivíduos com parentes de primeiro grau afetados, é de grande importância a realização desse estudo para identificação de alterações em novos genes que

podem estar envolvidos na tumorigênese do CM, possibilitando esclarecimento futuro das variadas etiologias e melhor compreensão da história natural da doença para tratamento eficaz de tumores associados às síndromes hereditárias.

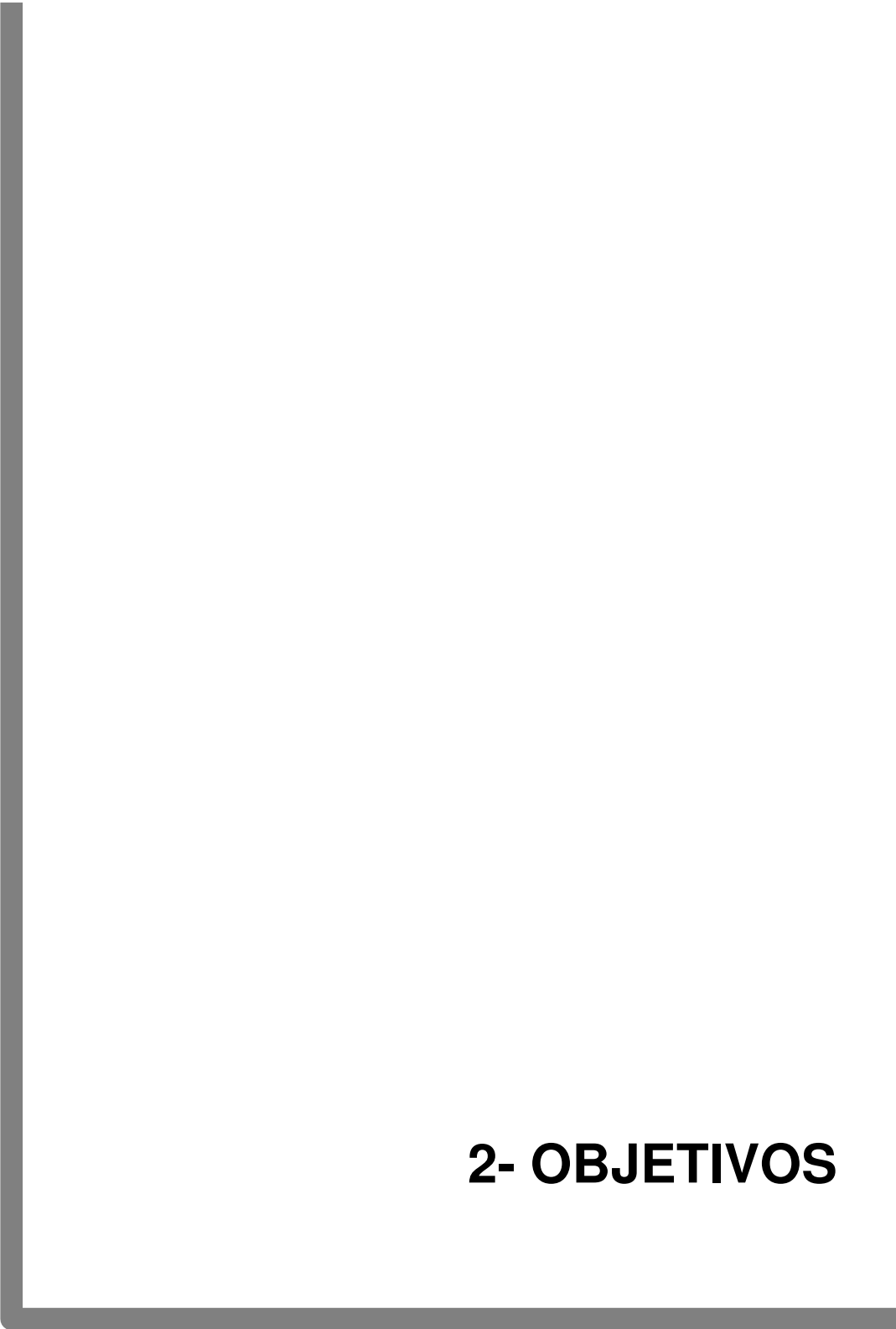


FONTE: Adaptado de Moldovan e D'Andrea, 2009 e Winter e Joenje, 2009

Figura 11- Vias de atuação dos genes *FANCD2* e *FANCI*

NOTA- A FANCD2 atua na interseção de três vias de sinalização. A radiação ionizante (IR) ativa ATM/ATR e resulta na fosforilação da FANCD2 (na serina 222) que ativa diversas outras proteínas que cooperam na resposta aos pontos de checagem do ciclo celular. Na segunda via, A RI ativa ATM/ATR que fosforila NBS que ativa FANCD2 por fosforilação que, por sua vez, ativa outras proteínas relacionadas aos pontos de checagem do ciclo celular. Na 3ª via, o complexo nuclear, formado pelas proteínas FANCA, B, C, E, F, G, L, M, e duas proteínas associadas FAAP24 e FAAP 100 provocam a monoubiquitinação de FANCD2 e FANCI através de FANCL (E3-ubiquitina ligase) e UBE2T (E2-ubiquitina conjugase) levando a ativação das proteínas que agem diretamente no reparo de DNA por recombinação homóloga. São elas: BRCA1, com FANCI, BRCA2/FANCD1 com FANCA e RAD51. As enzimas USP1/UAF1 são responsáveis pela deubiquitinação do

complexo FANCD2/FANCI. A histona H2AX é uma variante menor da histona altamente conservada H2A que é parte do octâmero do nucleossomo. Quando fosforilada por ATR as funções da γ H2AX são a de recrutar e de organizar as proteínas de reparo, bem como a de evitar a separação prematura das fitas cromossômicas nas forquilhas de replicação. Alterações em qualquer um dos genes codificadores das proteínas formadoras do complexo AF (*FANCA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L* e *M*), impedem a monoubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI e consequentemente prejudicam o sistema de reparo dos danos causados ao DNA, que ocorrem espontaneamente durante o processo de replicação ou por indução exógena.



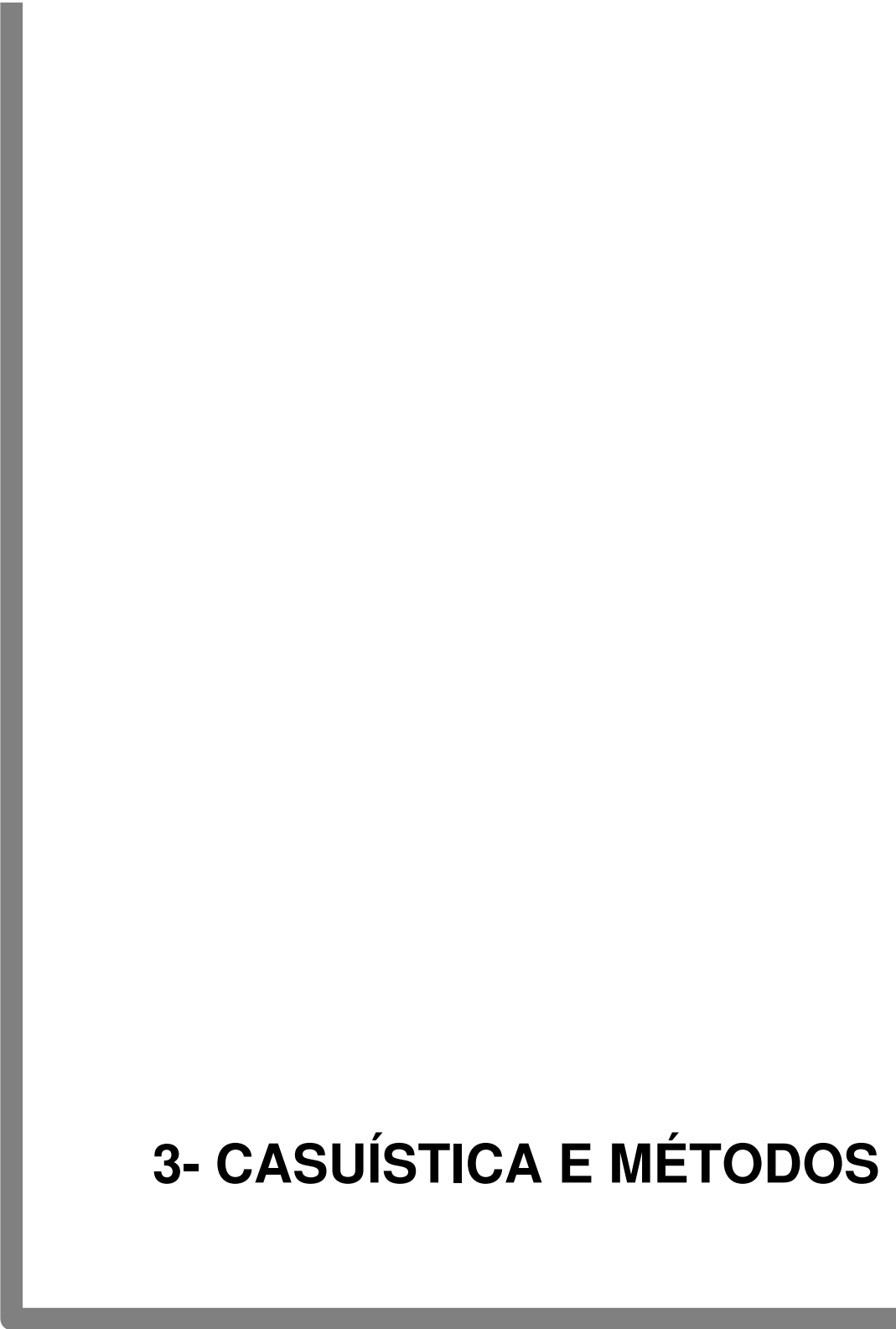
2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

- Analisar molecularmente os genes *FANCD2* e *FANCI* em mulheres com câncer de mama hereditário.

2.2- Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de mutações já relatadas nos genes *FANCD2* e *FANCI*;
- Rastrear completamente os genes por meio do sequenciamento automático;
- Analisar a correlação genótipo-fenótipo.



3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

Este foi um estudo prospectivo e descritivo com casuística formada por 137 mulheres brasileiras portadoras de câncer de mama com histórico familiar, escolhidas através de uma triagem realizada nos Ambulatórios do CAISM/UNICAMP, nos ambulatórios de Hematologia, Oncologia e por casos que nos foram enviados por diversos oncologistas. Do total, 76 indivíduos são advindos do HC-Unicamp, 61 indivíduos da Unifesp-SP. Uma parcela de indivíduos (45%) do HC/Unicamp fez parte de outro projeto onde outras mutações foram investigadas. Portanto, tratava-se de amostras de DNA estocadas nos laboratórios. Para o restante, houve a necessidade de coleta de sangue.

3.1.1- Critérios de inclusão/exclusão

Foram selecionados para o estudo indivíduos com CM com histórico familiar (pelo menos um familiar afetado), idade de manifestação entre 31 e 56 anos e que concordaram em participar do projeto por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido fornecido (Anexo 1). Os indivíduos com câncer sem história familiar e com idade de manifestação tardia (acima de 56 anos) não fizeram parte do estudo.

3.1.2- Aspectos éticos

Esta investigação exigiu a colaboração dos pacientes que foram submetidos à coleta de amostra de sangue no Ambulatório de Patologia da Mama do CAISM/Unicamp, o que não confere riscos adicionais, pois é procedimento rotineiro e simples. O seguimento subsequente da paciente portadora de um câncer continuará sendo realizado conforme protocolo do Serviço. A pesquisa manteve o anonimato da mulher, e a aceitação da paciente em participar do estudo foi totalmente facultativa, incluindo também o direito de ser tratada ou

seguida em outro Serviço. A não aceitação da paciente na participação neste estudo não implicou na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo Hospital.

A identificação destas alterações genéticas foi um processo árduo e uma área difícil, e estamos apenas começando a compreender as complexidades destes genes particulares. Deste modo, os resultados deste estudo provavelmente não terão aplicação clínica imediata.

De qualquer forma, a paciente será informada dos resultados que possam lhe interessar, ainda que não seja provável a alteração em seu tratamento, mas podem ser importantes futuramente para outros membros da família.

Concluindo, a participação da paciente foi realizada, exclusivamente, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo1). Foram obedecidos os preceitos do Código de Ética Médica para a utilização científica de dados de pacientes e respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (2000), emendada em Edimburgo, Escócia e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, 1996 (Brasil, 1996). O projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética da FCM/Unicamp (198/2006).

3.2- Métodos

Os métodos utilizados para a realização do trabalho foram: análise molecular por PCR (Saiki et al., 1989) associada à digestão enzimática (Tabelas 2 e 3). Foi realizada, paralelamente à análise mutacional, *screening* dos éxons por meio do sequenciamento automático.

3.2.1- Amplificação gênica e digestão enzimática

As mutações estudadas no presente estudo, os primers utilizados para amplificação dos éxons e o tamanho do amplificado estão relatados na tabela 2.

Tabela 2- Descrição das alterações estudadas, genes, éxons, primers e tamanho do amplificado

<u>GENES</u>	<u>ÉXON</u>	<u>ALTERAÇÃO</u>	<u>PRIMERS</u>	<u>PCR</u>
<u>FANCI</u>	2	165C>T	F:GTT GAG CAC CCA TTG CAT AA R:GGT CAC AAA TGC CCT CAA GT	426pb
	3	261C>T	F:TGG CGT CTC TGA ATG ATC TG R:CAG CAA CGC AAT CTC AGG TA	401pb
	10	866C>T	F:AGG CTG GTA TTG AAC TCC TG R:GGC TTG CTT AAG GAT GTG GT	474pb
	13	1264G>C	F:TGT CAT TGG AGA CCA ATT GC R:TTC CTT GTC CAC CAA ACT CC	483pb
	16	1686C>G	F:TGG GTA GAA ATG ACC TAA GGC R:TGC TCC ACC ACC AAC TAC TG	435pb
	19	1840C>T	F:GGC TTC CCC AGG ATT TTA CT R:ACC CAC AGC ATG TTC ACA AA	428pb
	20	2058C>A	F:TTG GCT GCA TTG TTC TTT GA R:GGA AGT GAT GGA AGC CTT GA	464pb
	21	2226G>C	F:GCA TTA GAA AAG GAT GCT GCT R:CCA TCA TTC AAT ACA GCT GAG	400pb
	22	2248T>C	F:CCT CAG CTG TAT TGA ATG ATG R:TCA GGG TCT GGG AAA TTC TG	433pb
	31	3321T>G	F:GGG TTT GAA TGT GCC AAT TT R:CAG GCC CAA AAG CAG ATT AG	442pb
	32	3453C>T	F:AGG GAC TAC CAG CCT GAG GA R:GGG GTC AGA TGA GAA CCA GA	413pb

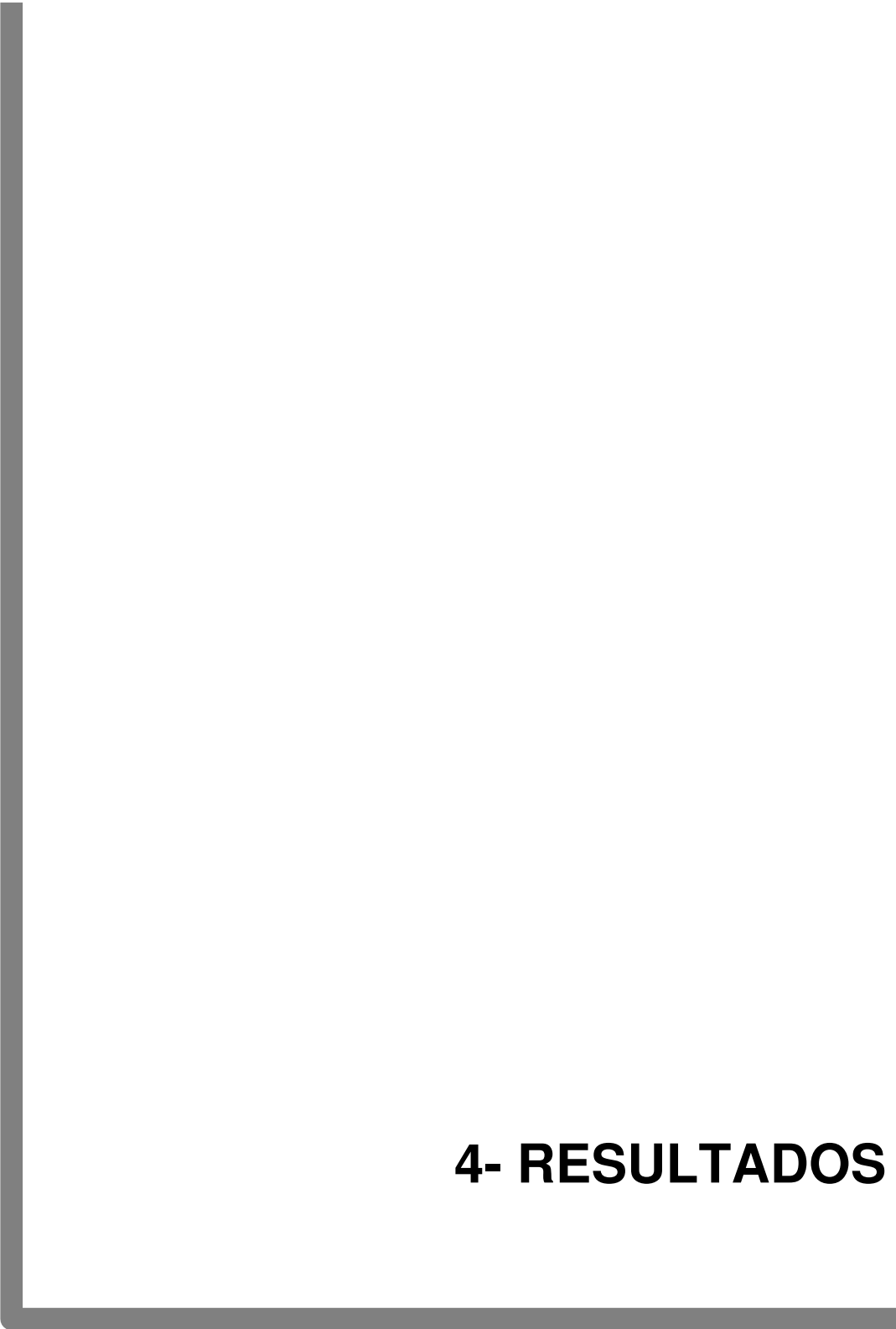
<u>GENES</u>	<u>ÉXON</u>	<u>ALTERAÇÃO</u>	<u>PRIMERS</u>	<u>PCR</u>
<u>FANCD2</u>	35	3666C>T	F:TAC TGG CAT TTG GGT CCT TC R:AGG CCA GAG GAT CAC TTG AA	495pb
	5	376A>G	F:TGC TTG TGC CAG CAT AAC TC R:GCT CTT TGC AAG GGA GAG GT	467pb
	5	Resina 222 (P)	F:TGC TTG TGC CAG CAT AAC TC R:GCT CTT TGC AAG GGA GAG GT	467pb
	10	782A>T	F:CCC AGC TCT GTT CAA ACC AT R:GAG GTT GCA GTT AGC GGA GA	414pb
	12	904C>T	F:TGA CAT TGC ATT GGC TAT TCT C R:TGT CGT CTG TCT GGG ATT GA	468pb
	12	958C>T	F:TGA CAT TGC ATT GGC TAT TCT C R:TGT CGT CTG TCT GGG ATT GA	468pb
	17	DEL17	F: AGG TCA AGA TGG GAT GGT CA R: CCA TCA TCT CAC CTC CTT CC	415pb
	19	LISINA 561(ub)	F: AGC CTA GGC AAC AAG AAC GA R: GCT AGG ATC ACA TTC CAG C	466pb
	21	1948-6C>A	F:GCA GAT TGG AAA AGG GAT GA R:AAG AGC CGT GAG ACA GGG TA	464pb
	26	2444G>A	F:CCA CGT TGT TGA GGA CAG TT R:TCC TGG CAG AAG GCA TTT AC	459pb
	37	3707G>A	F:AGG CAA TCT TCT TGG GCT TA R:AGG CAG GAG AAT TGC TTG AA	463pb
	38	3803G>A	F:ACA TGT GCA GGC CTC AGA AC R:AAA GGG GTT ATC CAG GAT GG	410pb

Tabela 3- Enzimas utilizadas na digestão para as diferentes alterações e o tamanho dos fragmentos

Mutação	Enzima	(-/-) pb	(+/-)pb	(+/+) pb
376A>G (D2)	HpaI	105,145 e 216	105,145, 250	216 e 250
904C>T (D2)	BamHI	110,290	96,110,194,290	96,110 e 194
958C>T (D2)	SphI	102, 160, 170	102,160,170,262	170 e 262
3707G>A (D2)	NlaIV	95,137	95,137 e 232	232
782A>T (D2)	Ava II	414	201+213+414	201,213
1948-6C>A (D2)	HindIII	103,361	103,171,190,361	103,171,190
2444G>A (D2)	MboII	228,231	228,231,459	459
3803G>A (D2)	BbvI	410	103,307,410	103,307
165C>T (I)	EcoRI	191,235	191,235,426	426
261C>T (I)	HaeIII	92,309	92,116,193,309	92,116,193
866C>T (I)	BpmI	474	153,321,474	153,321
1264G>C (I)	MboI	151,332	151,332,483	483
1686C>G (I)	HpaII	101,334	101,148,186,334	101,148,186
1840C>T (I)	ApoI	428	78,350,428	78,350
2058C>A (I)	PstI	173,291	173,291,464	464
2226G>C (I)	XmnI	139,261	93,139,168,261	93,139,168
2248T>C (I)	MboI	433	180,253,433	180,253
3321T>G (I)	HindIII	167,275	167,275,442	442
3453C>T (I)	ApoI	413	111,302,413	111,302
3666C>T (I)	DdeI	137,358	137,160,198,358	137,160,198

3.2.2- Sequenciamento automático

Os éxons foram submetidos ao sequenciamento automático direto paralelamente a análise das alterações relatadas. Na reação de sequenciamento utilizamos 1,0µl da PCR com a sequência desejada, 4,0µl do premix do kit Dyenamic Megabace™ 1000, 1,0µl de primer sense ou antisense com concentração de 5pmol/ul e 9,0µl de água de injeção. A reação foi realizada em aparelho termociclador e consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56-61°C por 15 segundos, dependendo do primer utilizado (anelamento) e 60°C durante 1 minuto. As amostras foram aplicadas em capilares presentes no aparelho MegaBace™1000 da GE e os resultados analisados pelo software MegaBace™ **Fragment Profiler** (Anexos 3 e 4).



4- RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue de 137 mulheres diagnosticadas para CM. A idade média de diagnóstico foi de 42,06 anos (com desvio padrão 5,6825 anos).

Em relação ao tipo histológico do câncer, 28,4% foram diagnosticadas com CDIS, 56,2% com CDI, 11,6% com CLIS e 3,6% com CLI. Após análise histológica tumoral, 23,4% apresentaram hiperexpressão da proteína c-erbB-2 e 46% positivos para RE.

Os indivíduos também foram questionados sobre estilo de vida no que se referiu à utilização de mutagênicos, tabagismo, uso de anticoncepcionais e reposição hormonal (Tabela 4a). 24,08% do total de indivíduos apresentaram alterações nos genes estudados, dos quais, 14,5% apresentaram alterações em *FANCD2* e 9,4% apresentaram alterações em *FANCI*.

Foram analisadas 20 alterações já descritas nos genes, oito em *FANCD2* e 12 em *FANCI*. Três indivíduos apresentaram heterozigose para a alteração 376A>G (Figura 12), cinco indivíduos para a 1948-6G>A (Figura 13), quatro para a 904C>T (Figura 14) e dois para a 728A>T (Figura 15) no gene *FANCD2* (Figura 16) e seis indivíduos apresentaram alteração 866C>T (Figura 17), dois para 1840C>T (Figura 18), dois para 165C>T (Figura 19) e um para 3321T>G (Figura 20) no gene *FANCI*.

O indivíduo CM37 apresentou alteração no sítio de ubiquitinação de *FANCD2* na posição 561 (lisina AAA para UAA - “OCRE” stop códon).

Em um total de 33 variantes encontradas, cinco variantes exônicas não relatadas foram identificadas em sete indivíduos: CM5, CM124 e CM43 (339C>T *FANCD2*) (Figura 21), CM96 (790G>A em *FANCI*), CM 76 (951C>T em *FANCI*), CM 83 (673G>A em *FANCD2*) e CM125 (1072C>T em *FANCD2*) (Tabela 4c).

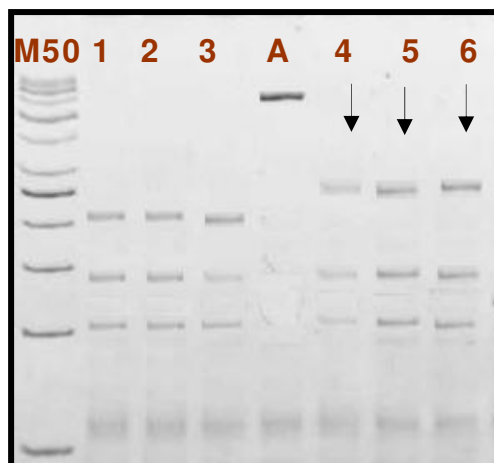


Figura 12- Gel de poliacrilamida 12% com amostras de seis indivíduos. Indivíduos 4 (CM39), 5 (CM58) e 6 (CM71) apresentaram heterozigose para a alteração 376A>G em *FANCD2* com fragmentos de 105, 145 e 250pb. **A= amplificado de 466pb. M50= Ladder de 50pb. 1, 2 e 3= indivíduos sem alteração**

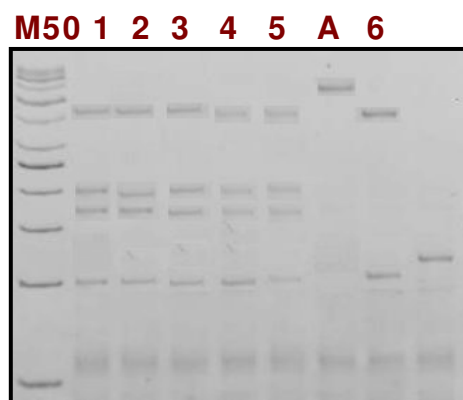


Figura 13- Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM13), 2 (CM63), 3 (CM55), 4 (CM103) e 5 (CM66) portadores de um alelo com a alteração 1948-6G>A em *FANCD2* com fragmentos de 103, 171, 190 e 361pb. **A= amplificado de 46 pb. M50= Ladder de 50pb. Indivíduo sem alteração (103 e 361pb)**

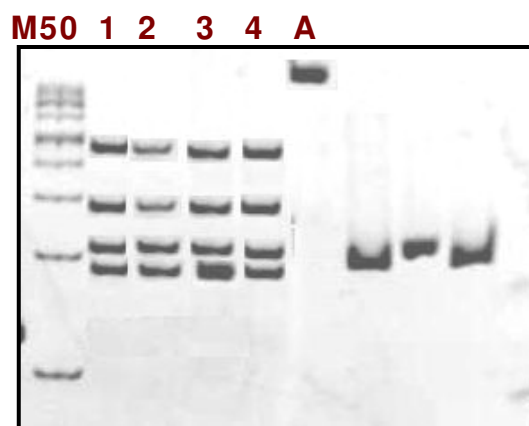


Figura 14- Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM78), 2 (CM89), 3 (CM49) e 4 (CM50) portadores de um alelo com a alteração 904C>T em *FANCD2* com fragmentos de 96, 110, 194 e 290pb. **A= amplificado de 468pb. M50= Ladder de 50pb. Indivíduo sem alteração (103 e 361pb)**



Figura 15- Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM27) e 2 (CM56) portadores de um alelo com a alteração 782A>T em *FANCD2* com fragmentos de 201, 213, 414pb. **A= amplificado de 414pb. M100= Ladder de 100pb**

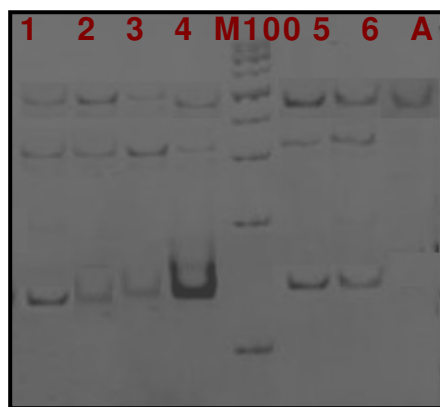


Figura 16- Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM29), 2 (CM11), 3 (CM24), 4 (CM19), 5 (CM62) e 6 (CM34) portadores de um alelo com a alteração 866C>T em *FANCI* com fragmentos de 153, 321 e 474pb. **A= amplificado de 474pb. M100= Ladder de 100pb**

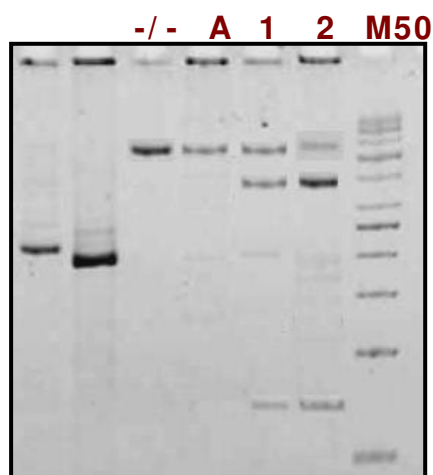


Figura 17- Gel de poliacrilamida 12% com amostras dos indivíduos 1 (CM17) e 2 (CM22) portadores de um alelo com a alteração 1840C>T em *FANCI* com fragmentos de 78, 350 e 428pb. **A= amplificado de 428pb. M50= Ladder de 50pb**

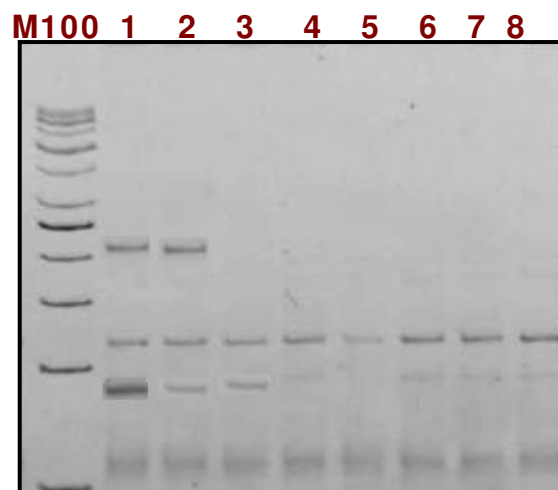


Figura 18- Gel de poliacrilamida 12% com amostra dos indivíduos 1 (CM 25) e 2 (CM32) portadores de um alelo com a alteração 165C>T em *FANCI* com fragmentos de 191, 235 e 426pb. **M100= Ladder de 100pb**

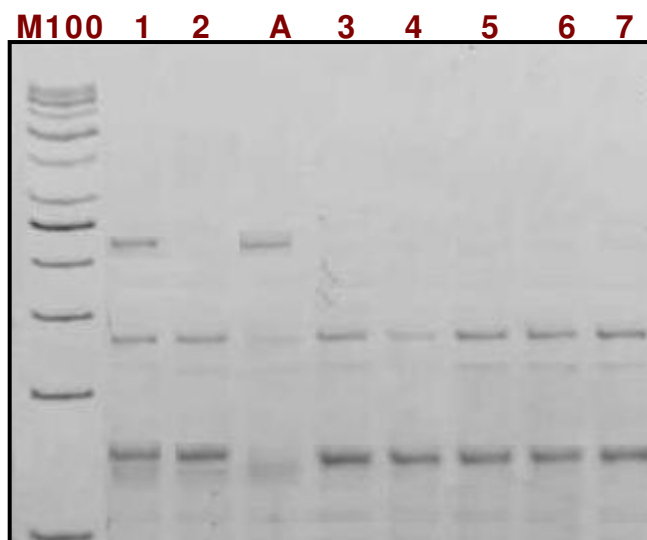


Figura 19- Gel de poliacrilamida 12% com amostra do indivíduo 1 (CM 112) portador de um alelo com a alteração 332T>G em *FANCI* com fragmentos de 167, 275 e 442pb. **A= amplificado de 442pb. M100= Ladder de 100pb. Indivíduos 2, 3, 4, 5, 6 e 7= sem a alteração**

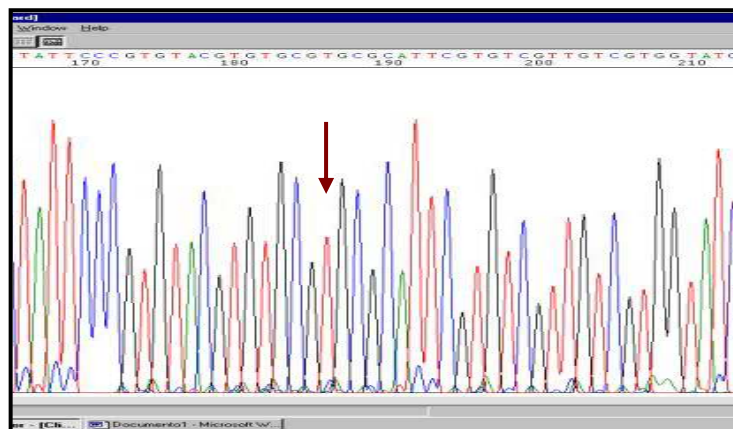
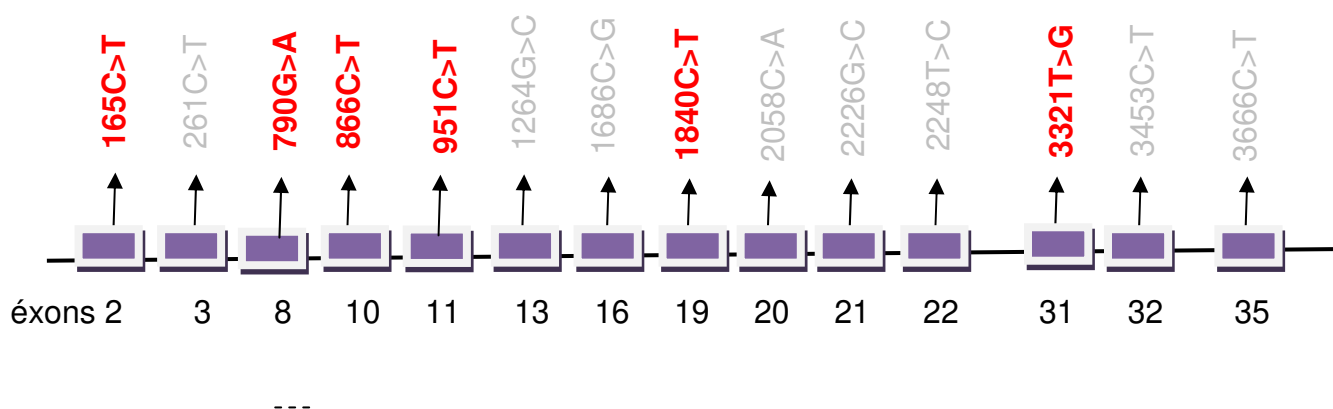
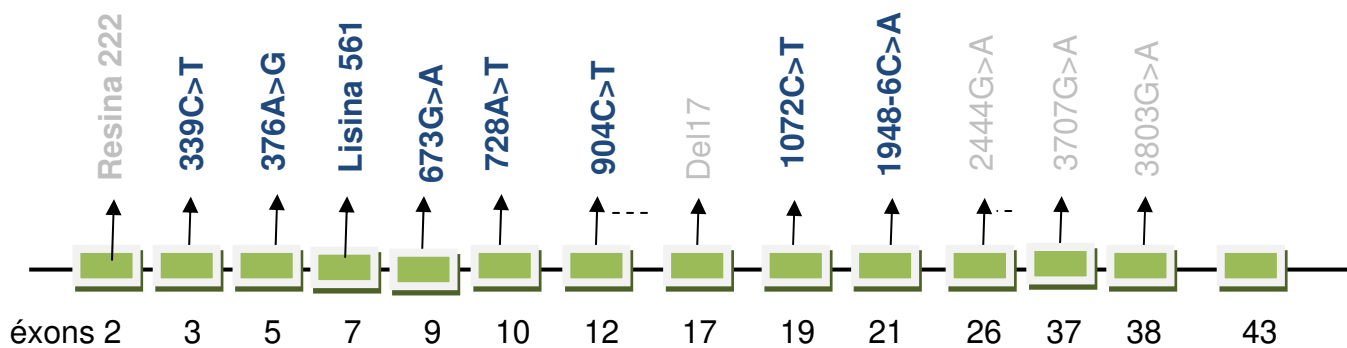


Figura 20- Exemplo de variante exônica: 339 C>T no gene *FANCD2* do indivíduo CM5. Após a realização do sequenciamento, houve a detecção da troca de uma guanina por uma timina no resíduo 339 (seta preta)



Fonte: própria autoria

Figura 21- Representação do gene *FANCI* com as mutações estudadas (em cinza), as encontradas (em vermelho) e seus éxons (em lilás)



Fonte: própria autoria

Figura 22- Representação do gene *FANCD2* indicando as mutações pesquisadas (em cinza), as mutações encontradas (em azul) e seus éxons (em verde)

Tabela 4a- Relação das informações clínico-histológicas das 137 mulheres pertencentes ao estudo. Idades de diagnóstico e atual, utilização de mutagênicos, tabagismo, uso de anticoncepcional ou reposição hormonal. Hachurados em verde estão os indivíduos que apresentaram alterações em um dos genes estudados

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM1	39/43	N	S	S	N
CM2	40/45	S	S	S	N
CM3	40/55	S	N	S	N
CM4	47/52	N	N	N	S
CM5	31/40	N	N	S	N
CM6	44/46	N	S	S	N
CM7	47/55	N	S	S	S
CM8	42/50	S	S	S	N
CM9	50/53	N	N	N	S
CM10	44/45	S	N	S	N
CM11	33/35	N	S	S	N
CM12	45/46	N	N	S	N
CM13	39/42	S	S	S	N
CM14	45/50	N	S	S	S
CM15	42/50	S	S	S	N
CM16	46/50	N	N	N	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM17	33/40	N	S	S	N
CM18	50/59	N	N	S	S
CM19	34/39	N	S	S	N
CM20	44/46	S	N	N	N
CM21	47/55	N	S	N	N
CM22	40/46	N	S	S	N
CM23	47/50	S	S	S	S
CM24	34/-	N	S	S	N
CM25	34/38	N	S	S	N
CM26	44/45	N	N	N	S
CM27	38/43	N	S	S	N
CM28	51/56	N	S	N	S
CM29	34/40	N	S	S	N
CM30	45/47	N	S	S	N
CM31	40/48	S	N	N	N
CM32	31/-	N	S	S	N
CM33	44/53	N	N	S	S
CM34	36/41	N	S	S	N
CM35	41/44	S	N	S	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM36	42/50	N	S	N	S
CM37	33/37	N	S	S	N
CM38	56/60	N	N	S	S
CM39	39/44	N	S	S	N
CM40	42/43	N	N	S	S
CM41	44/-	N	N	N	N
CM42	47/56	N	S	S	N
CM43	41/-	N	S	S	N
CM44	35/37	S	N	S	N
CM45	56/58	N	N	N	N
CM46	45/53	N	N	N	N
CM47	45/47	N	N	S	S
CM48	51/-	N	N	-	N
CM49	34/40	N	S	S	N
CM50	43/46	N	S	S	N
CM51	53/56	N	N	N	N
CM52	39/50	N	N	S	N
CM53	50/56	N	N	S	S
CM54	38/40	N	S	S	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM55	32/36	N	S	S	N
CM56	39/43	N	S	S	N
CM57	42/50	N	S	S	N
CM58	33/-	N	S	S	N
CM59	40/55	N	N	S	N
CM60	50/59	N	N	S	S
CM61	38/40	N	S	N	S
CM62	44/50	S	S	S	N
CM63	32/38	N	S	S	N
CM64	46/50	N	S	S	S
CM65	39/41	N	S	S	N
CM66	31/39	N	S	S	N
CM67	50/61	N	N	S	S
CM68	40/45	N	N	S	S
CM69	44/48	S	N	S	N
CM70	43/51	N	N	S	N
CM71	32/37	N	S	S	N
CM72	47/55	N	N	N	N
CM73	42/50	N	N	N	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM74	44/44	N	N	N	N
CM75	40/55	N	N	N	N
CM76	32/-	N	S	S	N
CM77	42/45	N	N	N	N
CM78	41/46	N	S	S	N
CM79	47/55	N	N	N	N
CM80	46/50	N	N	N	N
CM81	37/42	N	N	N	N
CM82	56/58	N	N	N	N
CM83	43/48	N	S	S	N
CM84	39/40	N	N	N	N
CM85	44/48	S	S	S	S
CM86	43/51	N	N	N	N
CM87	41/45	N	N	N	N
CM88	47/55	N	N	N	N
CM89	42/47	N	S	S	N
CM90	46/50	N	N	N	N
CM91	40/55	N	N	N	N
CM92	50/59	N	N	N	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM93	35/40	N	N	N	N
CM94	44/46	S	S	S	S
CM95	47/55	N	N	N	N
CM96	40/50	N	N	N	N
CM97	40/45	N	N	N	N
CM98	56/58	N	N	N	N
CM99	50/61	N	N	N	N
CM100	43/50	N	N	N	N
CM101	44/48	S	S	S	S
CM102	43/51	N	N	N	N
CM103	32/39	N	S	S	N
CM104	47/55	N	N	N	N
CM105	42/50	N	N	N	N
CM106	33/35	N	N	N	N
CM107	40/55	N	N	N	N
CM108	50/59	N	N	N	N
CM109	35/40	N	N	N	N
CM110	44/46	S	S	S	S
CM111	47/55	N	N	N	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM112	44/50	N	S	S	N
CM113	30/35	N	N	N	N
CM114	56/58	N	N	N	N
CM115	50/61	N	N	N	N
CM116	41/50	N	N	N	N
CM117	44/48	S	S	S	S
CM118	43/51	N	N	N	N
CM119	32/45	N	N	N	N
CM120	47/55	N	N	N	N
CM121	42/50	N	N	N	N
CM122	37/41	N	N	N	N
CM123	40/55	N	N	N	N
CM124	33/36	N	S	S	N
CM125	31/40	N	S	S	N
CM126	44/46	S	S	S	S
CM127	47/55	N	N	N	N
CM128	46/50	N	N	N	N
CM129	32/39	N	N	N	N
CM130	56/58	N	N	N	N

Registro	Idade D/A	Mutagênico	Tabagismo	Anticoncep.	Rep. Hormo.
CM131	49/51	N	N	N	N
CM132	46/51	N	N	N	N
CM133	44/48	S	S	S	S
CM134	43/51	N	N	N	N
CM135	46/50	N	N	N	N
CM136	43/45	N	N	N	N
CM137	42/50	N	N	N	N

D= idade diagnóstico, A= idade atual

Tabela 4b- Relação das informações das 137 mulheres pertencentes ao estudo. Antecedente familiar, tipo histológico tumoral, receptor estrógeno, c-erb-2 e resultado molecular. Hachurados em azul estão os indivíduos que apresentaram alterações em um dos genes estudados

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM1	S (2)	CDIS	-	+	N
CM2	S (1)	CDI	+	+	N
CM3	S (2)	CLIS	-	+	N
CM4	S (1)	CDIS	+	+	N
CM5	S (1)	CDI	-	+++	339C>T
CM6	S (1)	CDI	+	-	N

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM7	S (2)	CLIS	-	-	N
CM8	S (1)	CDIS	+	+	N
CM9	S (2)	CDIS	-	-	N
CM10	S (1)	CDIS	+	+	N
CM11	S (2)	CDI	-	++	866C>T
CM12	S (1)	CDIS	+	+	N
CM13	S (2)	CDI	-	++	1948-6G>A
CM14	S (1)	CDI	+	+	N
CM15	S (2)	CDIS	-	-	N
CM16	S (1)	CDI	+	+	N
CM17	S (2)	CDI	-	+++	1840C>T
CM18	S (1)	CLIS	-	-	N
CM19	S (2)	CDI	-	++	866C>T
CM20	S (1)	CLIS	-	-	N
CM21	S (2)	CDI	-	-	N
CM22	S (1)	CDI	-	+++	1840C>T
CM23	S (1)	CDIS	-	-	N
CM24	S (1)	CDI	-	+++	866C>T
CM25	S (2)	CDI	-	++	165C>T

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM26	S (1)	CDIS	+	+	N
CM27	S (2)	CDI	-	+++	782A>T
CM28	S (1)	CDI	+	+	N
CM29	S (2)	CDI	-	++	866C>T
CM30	S (1)	CDI	+	+	N
CM31	S (2)	CDI	-	-	N
CM32	S (1)	CDI	-	++	165C>T
CM33	S (2)	CLIS	-	-	N
CM34	S (1)	CDI	-	+++	866C>T
CM35	S (1)	CDI	+	+	N
CM36	S (1)	CDI	+	+	N
CM37	S (2)	CLIS	+	-	L561 (ub)
CM38	S (1)	CLIS	-	-	N
CM39	S (2)	CDI	-	+++	376A>G
CM40	S (1)	CDIS	+	+	N
CM41	S (1)	CDIS	-	-	N
CM42	S (1)	CDI	+	+	N
CM43	S (2)	CDI	-	+++	339C>T
CM44	S (1)	CDI	+	+	N

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM45	S (2)	CDI	-	-	N
CM46	S (1)	CDI	+	+	N
CM47	S (1)	CDI	-	-	N
CM48	S (1)	CDIS	+	+	N
CM49	S (2)	CDI	-	++	904C>T
CM50	S (1)	CDI	-	+++	904C>T
CM51	S (2)	CDI	+	+	N
CM52	S (1)	CDI	+	+	N
CM53	S (1)	CLIS	-	-	N
CM54	S (1)	CLI	+	-	N
CM55	S (2)	CDI	-	+++	1948-6G>A
CM56	S (1)	CDI	-	++	782A>T
CM57	S (2)	CDI	-	+	N
CM58	S (1)	CDI	-	+++	376A>G
CM59	S (1)	CDIS	+	+	N
CM60	S (1)	CDI	+	-	N
CM61	S (2)	CDI	-	+	N
CM62	S (1)	CDI	-	+++	866C>T
CM63	S (2)	CDI	-	++	1948-6G>A

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM64	S (1)	CDIS	+	+	N
CM65	S (1)	CDIS	-	+	N
CM66	S (2)	CDI	-	++	1948-6G>A
CM67	S (2)	CDI	+	+	N
CM68	S (1)	CLIS	-	-	N
CM69	S (2)	CDIS	-	+	N
CM70	S (1)	CDI	+	-	N
CM71	S (2)	CDI	-	+++	376A>G
CM72	S (1)	CDIS	+	+	N
CM73	S (2)	CLIS	-	-	N
CM74	S (1)	CDI	+	-	N
CM75	S (2)	CDIS	+	+	N
CM76	S (1)	CDI	-	+++	951C>T
CM77	S (1)	CDIS	-	+	N
CM78	S (1)	CDI	-	+++	904C>T
CM79	S (2)	CDI	-	+	N
CM80	S (1)	CLIS	-	-	N
CM81	S (2)	CDIS	-	+	N
CM82	S (1)	CDI	+	-	N

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM83	S (2)	CDI	-	+++	673G>A
CM84	S (1)	CDIS	+	-	N
CM85	S (2)	CLIS	-	-	N
CM86	S (1)	CDI	+	-	N
CM87	S (2)	CDIS	-	+	N
CM88	S (1)	CDIS	+	+	N
CM89	S (2)	CDI	-	++	904C>T
CM90	S (1)	CDI	+	+	N
CM91	S (2)	CDI	+	+	N
CM92	S (1)	CLIS	-	-	N
CM93	S (2)	CDIS	-	+	N
CM94	S (1)	CDI	+	+	N
CM95	S (1)	CDI	-	+	N
CM96	S (2)	CDI	-	+++	790G>A
CM97	S (2)	CLIS	-	-	N
CM98	S (1)	CDI	+	-	N
CM99	S (2)	CDIS	+	+	N
CM100	S (1)	CDIS	+	-	N
CM101	S (1)	CDIS	-	+	N

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM102	S (1)	CDI	+	-	N
CM103	S (2)	CDI	-	+++	1948-6G>A
CM104	S (1)	CLIS	+	-	N
CM105	S (2)	CDIS	-	+	N
CM106	S (1)	CDI	+	-	N
CM107	S (1)	CDI	+	-	N
CM108	S (1)	CDIS	+	+	N
CM109	S (2)	CLIS	-	-	N
CM110	S (1)	CDI	+	+	N
CM111	S (2)	CDIS	-	-	N
CM112	S (2)	CDI	-	+++	3321T>G
CM113	S (1)	CDIS	-	-	N
CM114	S (1)	CDI	+	+	N
CM115	S (2)	CDI	+	-	N
CM116	S (1)	CLIS	-	-	N
CM117	S (2)	CDIS	-	+	N
CM118	S (1)	CDI	+	+	N
CM119	S (1)	CDI	-	-	N
CM120	S (1)	CDIS	+	+	N

Registro	Antecedentes	Tipo Histol.	Receptor E	HER-2	Molecular
CM121	S (2)	CLIS	-	-	N
CM122	S (1)	CDI	+	+	N
CM123	S (2)	CDIS	+	-	N
CM124	S (2)	CDI	-	+++	339C>T
CM125	S (2)	CDI	-	++	1072C>T
CM126	S (1)	CDI	+	+	N
CM127	S (2)	CDI	-	-	N
CM128	S (1)	CLIS	-	-	N
CM129	S (2)	CDIS	-	-	N
CM130	S (1)	CDI	+	+	N
CM131	S (1)	CDI	+	+	N
CM132	S (1)	CDIS	+	+	N
CM133	S (2)	CLIS	-	-	N
CM134	S (1)	CDI	+	+	N
CM135	S (2)	CDIS	-	-	N
CM136	S (1)	CDIS	+	+	N
CM137	S (1)	CDIS	-	-	N

L561= Lisina 561; S= sim; N= Não; CDIS= carcinoma ductal *in situ*; CDI= carcinoma ductal invasor; CLIS= carcinoma lobular *in situ*; CLI= carcinoma lobular invasor

Tabela 4c- Informações dos indivíduos portadores de alterações nos genes estudados

Registro	ID	M	T	AC	RH	ATD	TH	RE	HER-2	Molecular FANCD2	Molecular FANCI
CM5	31	N	N	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++	339C>T	
CM11	33	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++		866C>T
CM13	39	S	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	1948-6G>A	
CM17	33	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++		1840C>T
CM19	34	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++		866C>T
CM22	40	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++		1840C>T
CM24	34	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	++++		866C>T
CM25	34	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++		165C>T
CM27	38	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++	782A>T	
CM29	34	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++		866C>T
CM32	31	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	++		165C>T
CM34	36	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++		866C>T
CM37	33	N	S	S	N	S (2)	CLIS	(+)	-	Lisin 561	
CM39	39	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++	376A>G	
CM43	42	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++	339C>T	
CM49	34	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++	904C>T	

Registro	ID	M	T	AC	RH	ATD	TH	RE	HER-2	Molecular FANCD2	Molecular FANCI
CM50	43	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++	904C>T	
CM55	32	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	1948-6G>A	
CM56	39	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	++	782A>T	
CM58	33	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++	376A>G	
CM62	44	S	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++		866C>T
CM63	32	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	1948-6G>A	
CM66	31	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	1948-6G>A	
CM71	32	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++	376A>G	
CM76	32	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++		951C>T
CM78	41	N	S	S	N	S (1)	CDI	(-)	+++	904C>T	
CM83	43	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	673G>A	
CM89	42	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++	904C>T	
CM96	40	N	N	N	N	S (2)	CDI	(-)	+++		790G>A
CM103	32	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++	1948-6G>A	
CM112	44	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++++		3321T>G
CM124	33	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	+++	339C>T	
CM125	31	N	S	S	N	S (2)	CDI	(-)	++	1072C>T	
TOTAL	37,5 anos	93,7% N	93,7% S	96,0% S	100% N	100% S	100% CDI	100% (-)	96% HE	14,5% (20)	9,4% (13)

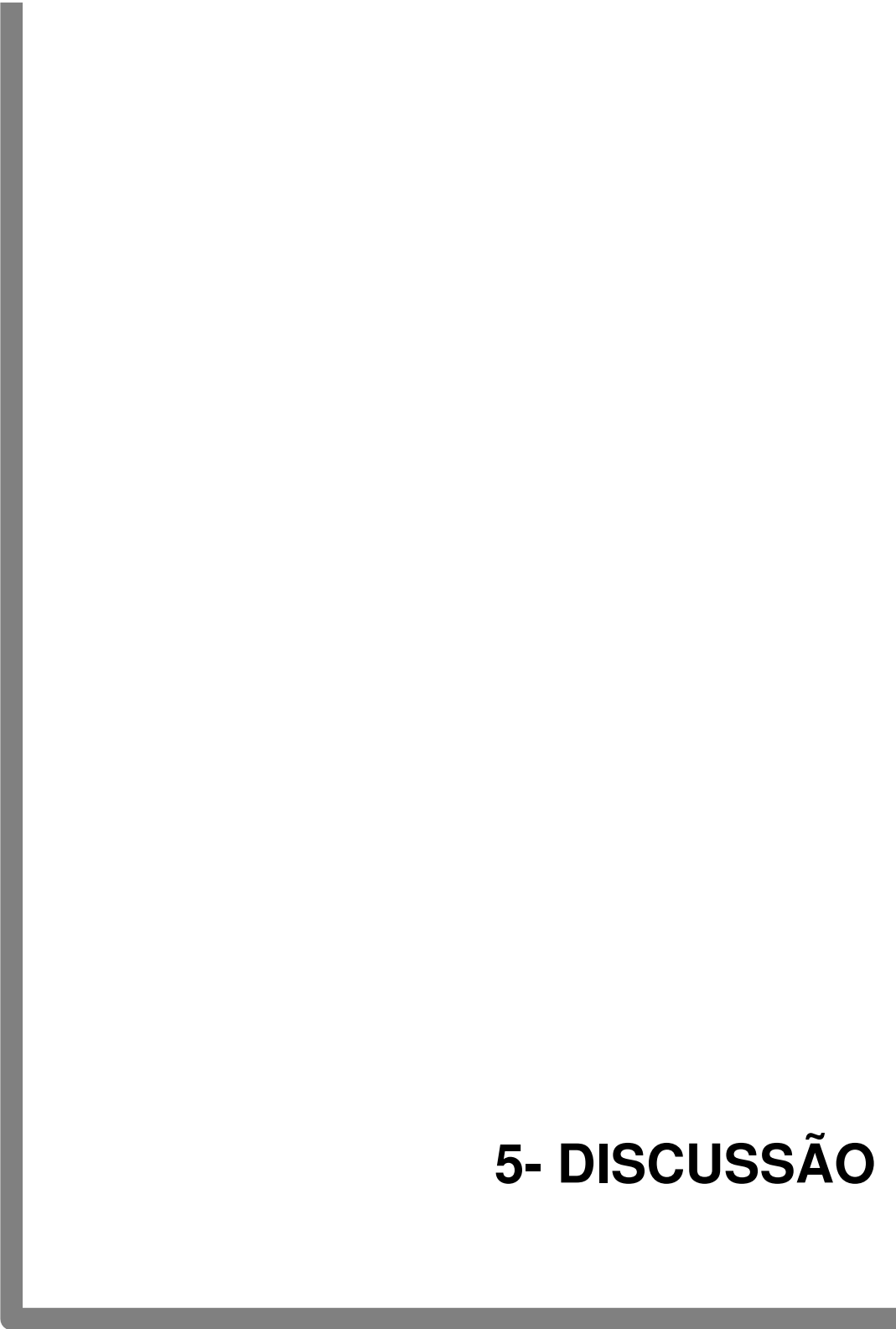
ID= idade diagnóstico; M= mutagênicos; T= tabagismo; AC= anticoncepcional; RH= reposição hormonal; ATD= antecedentes; TH= tipo histológico; CDI= Carcinoma Ductal Invasor; HE= hiperexpresso; RE= receptores de estrogênio; (-) não presente; S= sim; N= não

Tabela 4d- Relação entre indivíduos com e sem mutações e características clínico-histológicas (tabagismo, uso de anticoncepcional, tipo histológico CDI, receptor de estrógeno - e hiperexpressão de HER-2)

	Tabagismo	Anticoncepcional	CDI	RE-	HER-2	TOTAL
COM mutação	31 (93,9%)	32 (96%)	33 (100%)	33 (100%)	32 (96%)	33
SEM mutação	23 (22,1%)	40 (38,4%)	46 (41%)	46 (41%)	- (0)	104
TOTAL N=137	54 (39,4%)	72 (52,5%)	79 (57,6%)	79 (57,6%)	32 (23,3%)	

CDI= carcinoma ductal invasor; RE-= receptor de estrógeno negativo; HER-2= hiperexpressão de HER-2

Comparando o grupo de pacientes onde foi detectada mutação e grupo de pacientes onde não foi encontrada mutação com relação ao tabagismo, uso de anticoncepcional por mais de dez anos, tipo histológico, ausência de receptor de estrógeno e hiperexpressão do HER-2 verificamos diferenças estatisticamente significativas, respectivamente χ^2 (correção de Yates)= 51,15-P<0,0000001, OR= 54,59 (IC:12,14-245,4); χ^2 (correção de Yates)= 32,09-P<0,0000001, OR= 51,2 (IC:6,73-389,5); χ^2 (correção de Yates)= 29,67-P<0,0000001; χ^2 (correção de Yates)= 126,2-P<0,0000001 (Martin e Austin,1991).



5- DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas 137 mulheres com câncer de mama com relação à presença de mutações nos genes *FANCD2* e *FANCI*. Foram detectadas alterações em 33 pacientes (24,08%).

Até o momento somente um estudo foi realizado avaliando mutações no gene *FANCD2* em mulheres portadoras de Ca de mama. Nesse estudo, Lewis et al. (2005) analisaram seis mutações exônicas antes descritas, pelo Instituto Rockefeller - USA departamento de estudo de Anemia de Fanconi, em indivíduos com CM e triaram mutações no gene. Foram triados também por DHPLC os seguintes genes: *BRIP1/BACH1*, *LMO4* e *SFN*. Das seis mutações em *FANCD2*, três foram encontradas (1948-6G>A, 376A>G e 165C>T) em 21 indivíduos e muitas alterações intrônicas. Essas três mutações foram encontradas em nosso estudo em 10 indivíduos e o interessante é que o nucleotídeo é conservado em murinos (Reliene et al., 2010). Não houve análise da correlação entre mutações e fatores clínico-histológicos.

Não havia, até o momento, estudo triando mutações em *FANCI* em indivíduos com CM e, muito menos, a análise, em conjunto, dos genes *FANCD2* e *FANCI*. Em virtude de que esses genes dependem um do outro para realizarem a função chave da via AF/BRCA, nada mais relevante do que a análise precisa desses genes em indivíduos com CM.

Os estudos de Kalb et al., (2007), Dorsman et al., 2007 e Sims et al., 2007 foram realizados em indivíduos portadores de Anemia de Fanconi para análise, separadamente, das alterações em *FANCD2* e *FANCI*. Um número significativo de indivíduos (pertencentes aos grupos de complementação AF-D2 e AF-I) apresentou alterações nos genes e clínica mais grave com presença de tumores sólidos em idade mais avançada, quando comparados a outros grupos. Houve a identificação de um total de 66 mutações alélicas nos genes *FANCD2* e *FANCI*. Diferente do nosso estudo houve a identificação de indivíduos com as mutações 2248T>C, 261C>T, 3707G>A e 958C>T. Nosso estudo, realizado em mulheres com Ca de mama, se baseou nas informações das mutações oriundas desses trabalhos e dos dados provenientes do *database* da AF do Instituto Rockefeller- NY - EUA.

Das 20 alterações estudadas por PCR e digestão, 18 delas são do tipo missense com troca de aminoácido na sequência da proteína (alteram a estrutura protéica secundária), uma é do tipo deleção (altera a matriz de leitura) e outra altera o sítio de *splicing*. Cinco indivíduos apresentaram a alteração 1948-6C>A, o que pode levar a produção de uma proteína quimérica. Apresentaram uma taxa muito elevada da proteína c-erbB-2 na membrana tumoral e, de acordo com as informações clínicas fornecidas, esses indivíduos não estão respondendo bem ao tratamento, apresentando um prognóstico muito ruim.

Após a análise das mutações estudadas por PCR e digestão, o sequenciamento foi realizado e foram encontradas 24 alterações das quais 10 no gene *FANCD2* e 14 no gene *FANCI*. Do total (todas exônicas sem envolver a região de *splicing*), cinco não foram relatadas anteriormente, sendo consideradas mutações novas. As restantes 19 eram alterações silenciosas previamente relatadas em que a substituição de um nucleotídeo na sequência de DNA não alterou o código na trinca de bases não levando a substituição do aminoácido.

Após análise da localização das cinco mutações novas nos seus respectivos éxons e do produto formado pudemos concluir que duas delas desencadeiam a formação de um *stop* códon afetando, portanto, a síntese do produto protéico final (790G>A e 673G>A), e, três outras (339C>T, 951C>T e 1072C>T) provocam a troca de um aminoácido na sequência. Existem mutações descritas localizadas próximas ao aminoácido 951. São elas: 904 C>T e 958C>T, portanto podemos inferir que essa região é importante para a função da proteína. A região na qual está localizada a mutação 339C>T é região de ligação justamente com a proteína *FANCI*, uma região de grande importância, daí se pode inferir tratar-se também de uma mutação deletéria.

Não foram encontradas deleções exônicas. Seria de grande valia verificar se essas variantes são polimorfismas (encontrados em mais de 1% da população).

Uma alteração no sítio de ubiquitinação (Lisina 561) foi encontrada em um indivíduo com características distintas das dos outros indivíduos com alterações. Foi o único a apresentar CLIS e expressão negativa de HER-2, além de presença de receptores de estrógeno, portanto um prognóstico muito bom.

Com relação às manifestações clínicas, os indivíduos com alterações apresentaram as seguintes informações clínico-histológicas: idade de manifestação entre 31 e 44 anos, tabagismo (93,7% eram fumantes), uso de anticoncepcional por mais de 10 anos (96%), Carcinoma Ductal Invasor (CDI) (100%), ausência de receptores estrogênicos (100%) e hiperexpressão de HER-2 (100%) significativa.

A análise estatística dos dados clínicos versus a presença ou não das mutações foi realizada pelo método de Chi Square com correção de Yates. Houve diferença significativa entre os dados clínicos dos indivíduos com e sem mutação para todos os dados clínicos com valor $p < 0.000001$. Todos os indivíduos com as alterações apresentaram hiperexpressão de HER-2 na membrana das biópsias tumorais, quando comparado ao restante da casuística.

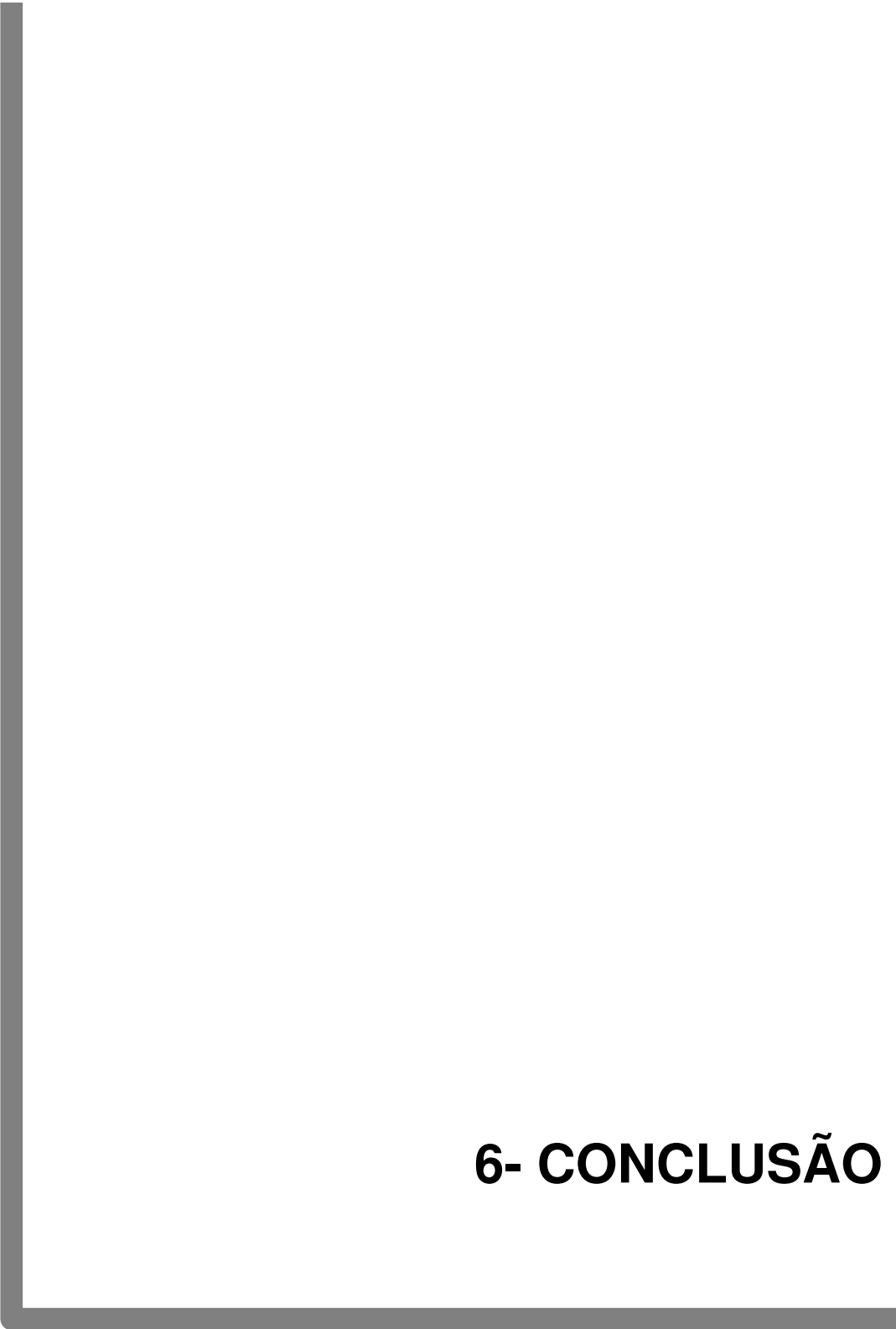
Na literatura indivíduos com anemia de Fanconi com alterações em *FANCD2* e *FANCI* apresentam uma clínica mais grave com presença de tumores em idade mais avançada, quando comparados a outros grupos ($p > 0.0000001$) (Kalb *et al.*, 2007). Portanto, parece que em relação ao câncer de mama essa característica de gravidade se mantém.

Esse estudo foi de grande valia para a detecção de alterações que pudessem desencadear o desenvolvimento do câncer em indivíduos com CM com histórico familiar sem mutações em genes de alta suscetibilidade, como também servir para caracterizar um tipo histológico distinto auxiliando na terapêutica futura.

De acordo com os resultados encontrados e com informações provenientes da literatura pudemos refletir sobre diversos fatores: **1)** indivíduos heterozigotos para mutações em genes da via AF/BRCA apresentam uma

predisposição ao desenvolvimento de neoplasias. Estudos mostraram uma relação significativa entre mutações em um alelo dos genes *FANCN*, *FANCI* e *FANCD2* e o desenvolvimento de cânceres de mama e fígado o que antes não era cogitado (García e Benítez, 2008; Barroso et al., 2009; Palagyi et al., 2010; IFAR-Instituto Rockefeller - NY). O gene *FANCD2* se comporta como um “oncogene” nas síndromes de cânceres hereditários e como supressor tumoral na síndrome de Fanconi? Ou seja, a presença de um alelo levaria ao ca de mama e a homozigose a Anemia de Fanconi? Mas e os pais de crianças que apresentam Fanconi e que não apresentam síndromes de câncer hereditário? **2)** Há a possibilidade da ocorrência de um segundo evento (outro alelo) nas células do tecido da mama desencadeando a proliferação desordenada das células do tecido? (Barroso et al., 2006 e 2010; Lewis et al., 2005). As mesmas mutações nos genes *FANCD2* e *FANCI* podem levar a Anemia de Fanconi com quadro hematológico e ao ca de mama? Em relação a essa questão podemos contribuir uma vez que encontramos mutações já descritas para Anemia de Fanconi em portadores de Ca de mama hereditário onde os genes de maior penetração foram excluídos. Esse fato nos leva a inferir se haveria um segundo mecanismo ou mesmo alguma interação ambiental que determine o desenvolvimento do quadro hematológico ou do ca de mama. Enfim, esse conhecimento da interação dessas proteínas no sistema de reparo por recombinação homóloga levantou muitas questões que necessitam de maiores estudos.

Lentamente, e com afinco, podemos cada vez mais descobrir o funcionamento dessas interações protéicas com relação a etiologia do câncer e utilizá-los para ajudar os indivíduos com um risco maior para desenvolver a doença.



6- CONCLUSÃO

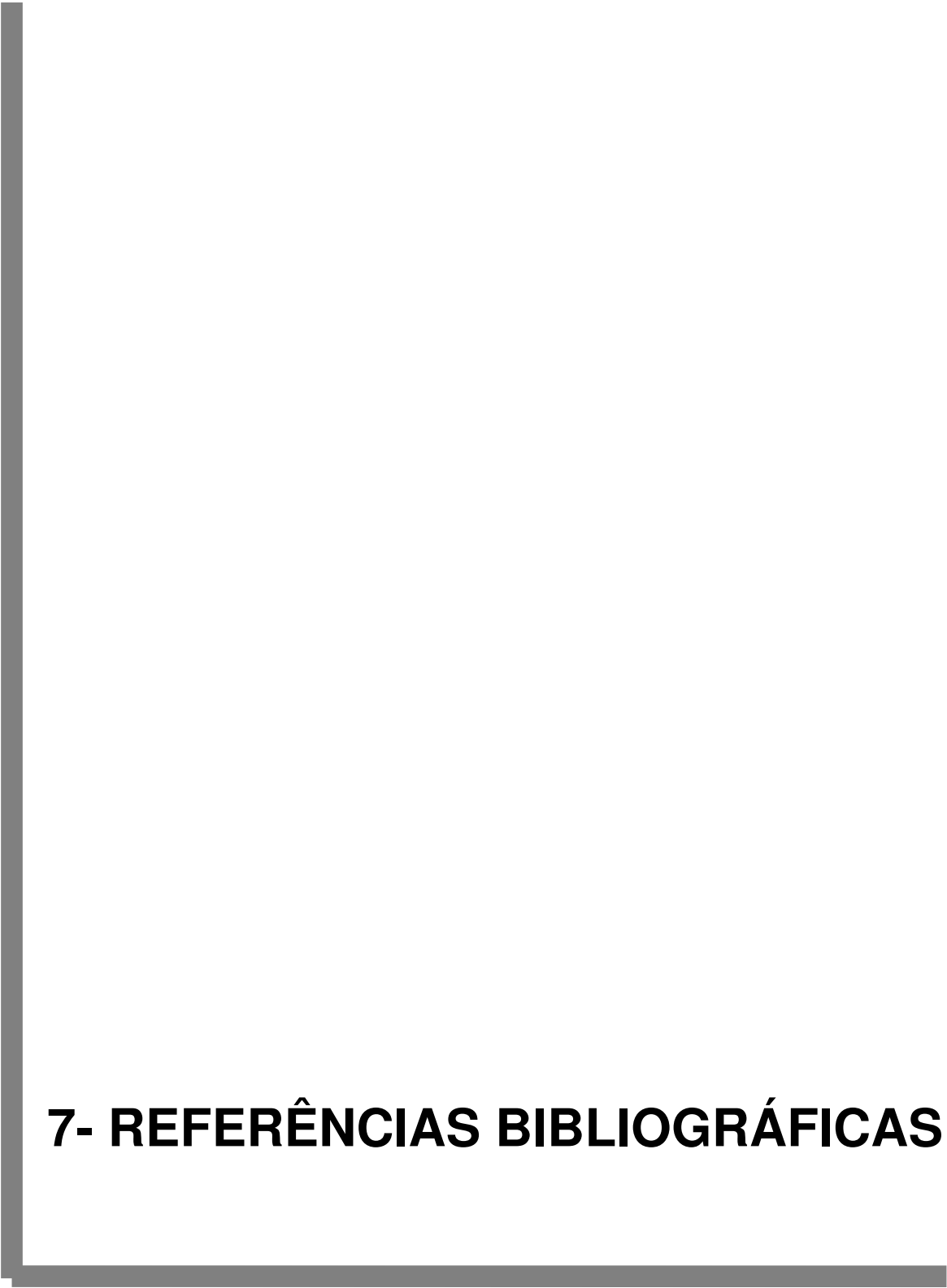
- Concernente à identificação de mutações:

- 1) Foram identificadas 33 mulheres portadoras de mutações nos genes *FANCD2* e *FANCI* (24,08%).
- 2) Foram identificadas 24 mutações, sendo que cinco eram novas e 19 neutras. Das mutações novas, duas levam à formação de um *stop* códon e três missense (sentido trocado).

- Relacionado à correlação entre presença de mutação e dados clínicos:

- 1) Nossos dados mostram uma apresentação clínica mais severa dos portadores de mutações nos genes *FANCD2* e *FANCI* ($p > 0.0000001$), prevendo uma evolução avançada e prognóstico ruim.
- 2) Identificação da relação entre presença de mutação e tabagismo. Há diferença significativa entre indivíduos fumantes com mutações (93,9%) e indivíduos fumantes sem as mutações (22,1%) ($p > 0.0000001$).
- 3) Identificação da relação entre presença de mutação e administração de anticoncepcionais por um período em torno de 10 anos. Há diferença significativa entre indivíduos que usaram AC e apresentaram as mutações (96%) e indivíduos que usaram AC sem as mutações (38,4%) ($p > 0.0000001$).
- 4) Correlação estatística entre a ausência de receptores de estrógeno e indivíduos portadores de alterações ($p > 0.0000001$). Todos os indivíduos com as alterações (33) não apresentaram receptores na membrana das biópsias tumorais, quando comparado ao restante da casuística sem a presença de mutação (41%).
- 5) Correlação estatística entre a hiperexpressão de HER-2 e indivíduos portadores de alterações ($p > 0.0000001$). Todos os indivíduos com as alterações apresentaram hiperexpressão de HER-2 na membrana das biópsias tumorais, quando comparado ao restante da casuística que não apresentou expressão significativa.

- 6) Não houve correlação entre idade de manifestação e presença de mutação ($p>0.19$).
- 7) Presença de uma alteração no sítio de ubiquitinação (Lisina 561) de *FANCD2* em um indivíduo com características distintas das dos outros indivíduos com alterações. Diferente dos demais apresentou CLIS e expressão negativa de HER-2, além da presença de receptores de estrógeno.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts BD, Lewis J, Raff M, Roberts Watson JD. Câncer In: Biologia Molecular da Célula. 3ªed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p1255-91.

Albrektsen G, Heuch I e Thoresen SØ. Histological type and grade of breast cancer tumors by parity, age at birth, and time since birth: a register-based study in Norway. BMC Cancer 2010; 10:226.

Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. Am J Hematol 1996; 53: 99-110.

Amar S, McCullough AE, Tan W et al. Prognosis and Outcome of Small (≤ 1 cm), Node-Negative Breast Cancer on the Basis of Hormonal and HER-2 Status. Oncologist. 2010 Oct 7. [Epub ahead of print].

America Cancer Society, 2010; <http://www.cancer.org>.

Ameziane N, van den Ouweland AM, Adank MA, Vijzelaar RN, Errami A, Dorsman JC, et al. Lack of large genomic deletions in BRIP1, PALB2, and FANCD2 genes in BRCA1/2 negative familial breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2009; 118:651-3.

ASCO - American Society of Clinical Oncology, 2010. www.asco.org.

Andersen TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. Acta Oncol 1996; 35(4): 407-10.

Anderson RL. Understanding breast cancer risk. Radiol Technol 2010; 81(5):457M-476M.

Anderson WF, Pfeiffer RM e Dores GM et al. Comparison of age distribution patterns for different histopathologic types of breast carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006; 15(10):1899-905.

Ansquer Y, Delaney S, Santulli P et al. Risk of invasive breast cancer after lobular intra-epithelial neoplasia: review of the literature. Eur J Surg Oncol 2010; 36(7):604-9.

Auerbach AD. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 2003; 8:8.

Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 2009; 668(1-2):4-10.

Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients: A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51:1-12.

Azim H e Azim HA Jr. Targeting Her-2/neu in breast cancer: as easy as this! *Oncology*. 2008; 74(3-4):150-7.

Bakarakos P, Theohari I, Nomikos A et al. Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. *Histopathology*. 2010; 56(7):876-82.

Banneau G, Guedj M, MacGrogan G et al. Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(4): R63.

Barroso E, Milne RL, Fernández LP et al. FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2006; 27(9):1930-7.

Barroso E, Pitas G e Arias JL et al. The fanconi anemia family of gene and its correlation with breast câncer susceptibility and breast câncer features. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118:655-60.

Baselga J, Perez EA, Pienkowski T et al. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*. 2006;11 Suppl 1:4-12.

Bell DW, Kim SH, Godwin AK et al. Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *Int J Cancer*. 2007; 121(12):2661-7.

Bernstein LA. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 2002; 7:3-15.

Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D et al. Gene expression profiling of inflammatory breast cancer. *Cancer* 2010; 116(11 Suppl):2783-93.

Bohr VA. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis*, 16(12): 2885-2892, 1995.

Bordeleau L, Panchal S e Goodwin P. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(1):13-24.

Breast Cancer Case-Control Consortium. CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 2004; 74:1175-82.

Brody L, Biesecker B. Breast cancer susceptibility genes, BRCA1 and BRCA2. *Medicine*, 77: 208-26, 1998.

Brinton LA, Achairer C, Hoover RN et al. Menstrual factors and risks of breast cancer. *Cancer Invest* 1988; 6:245-54.

Butturini A, et al. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1994; 84:1650-55.

Buzdar AU. Role of biologic therapy and chemotherapy in hormone receptor- and HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2009; 20(6):993-9.

Byrnes GB, Southey MC e Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? *Breast Cancer Res*. 2008; 10(3):208.

Campeau PM, Foulkes WD e Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008; 124(1):31-42.

Carey LA. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010. *Clin Breast Cancer* 2010; 10(3):188-95.

Chacko P, Joseph T, Mathew BS, Rajan B, Pillai MR. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutat Res*, 581(1-2): 153-63, 2005.

Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Viens P, Bertucci F. Defining the molecular biology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol*. 2008; 35:41-50.

Chen P, Liang J, Wang Z et al. Association of common PALB2 polymorphisms with breast cancer risk: a case-control study. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(18): 5931-7.

Chia YH, Ellis MJ, Ma CX. Neoadjuvant endocrine therapy in primary breast cancer: indications and use as a research tool. *Br J Cancer* 2010; 103:759-64.

Chivukula M, Haynik DM, Brufsky A, Carter G, Dabbs DJ. Pleomorphic lobular carcinoma in situ (PLCIS) on breast core needle biopsies: clinical significance and immunoprofile. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32:1721-6.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9:606-16.

Colditz GA, Willet WC, Hunter DJ. Family history, age, and risk of breast cancer. *JAMA* 1993; 270: 338-43.

Contreras A, Sattar H. Lobular neoplasia of the breast: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(7):1116-20.

Couzin J. The twists and turns in BRCA's path. *Science* 2003; 302:591-93.

Cristofanilli M. The biological information obtainable from circulating tumor cells. *Breast* 2009; 18 Suppl 3:S38-40.

Crum CP. Trato genital e mama femininos. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional*. 5^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 936-1002.

Dachs GU, Kano M, Volkova E et al. A profile of prognostic and molecular factors in European and Maori breast cancer patients. *BMC Cancer* 2010; 10(1):543.

D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 362(20): 1909-19.

D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:23-34.

De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G et al. A novel breast cancer-associated BRIP1 (FANCF/BACH1) germ-line mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(14): 4672-80.

de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res*. 2009;668:11-9.

Decker T, Hungermann D, Böcker W et al. Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer: update 2009. *Pathologe* 2009; 30(1):49-55.

Deroo LA, Vlastos AT, Mock P et al. Comparison of women's breast cancer risk factors in Geneva, Switzerland and Shanghai, China. *Prev Med*. 2010 Oct 1 [Epub ahead of print].

Dorsman JC, Levitus M, Rockx D et al. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 2007; 29(3):211-8.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):208-221.

Duraker N, Caynak ZC. Prognostic value of the 2002 TNM classification for breast carcinoma with regard to the number of metastatic axillary lymph nodes. *Cancer* 2005; 104(4):700-7.

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

Edlich RF, Cross CL, Wack CA et al. Breast cancer and ovarian cancer genetics: an update. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2008; 27(4):245-56.

Edwards BK, Howe HL, Ries IA, Thum MJ et al. Annual report to the nation on the status of cancer 1973-99 featuring implications of age and aging on US. *Cancer Burden* 2002; 94:2766-92.

Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(19): 1380-8.

Ellisen L, Haber D. Hereditary breast cancer. *Ann Rev Med* 1998; 49: 425-36.

Escobar PF, Patrick RJ, Rybicki LA et al. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(1):143-7.

Esmer C, Sánchez S, Ramos S et al. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet A*. 2004; 124A(1): 35-9.

Fanconi G. Familiaere infantile perniziosaartige Anaemie (pernizioeses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch Kinderheild* 1927; 117:257-80.

Fenton H, Carlile B, Montgomery EA et al. LKB1 protein expression in human breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006; 14(2): 146-53.

Foulkes WD, Reis-Filho JS, Narod SA. Tumor size and survival in breast cancer-a reappraisal. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(6):348-53.

Frank TS e Critchfield GC. Hereditary risk of women's cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16:703-13.

Frio TR, Haanpää M, Pouchet C et al. Mutation analysis of the gene encoding the PALB2-binding protein MRG15 in BRCA1/2-negative breast cancer families. *J Hum Genet*. 2010 Sep 16.

Fujii H, Anbazhagan R, Bornman DM et al. Mucinous cancers have fewer genomic alterations than more common classes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76(3):255-60.

García MJ, Benítez J. The Fanconi anaemia/BRCA pathway and cancer susceptibility. Searching for new therapeutic targets. *Clin Transl Oncol*. 2008; 10(2): 78-84.

Genestie C, Zafrani B, Asselain B et al. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res* 1998; 18(1B):571-6.

Godthelp BC, van Buul PP, Jaspers NG, Elghalbzouri-Maghrani E, van Duijn-Goedhart A, Arwert F, et al. Cellular characterization of cells from the Fanconi anemia complementation group, FA-D1/BRCA2. *Mutat Res* 2006; 601:191-201.

Golubicic I, Borojevic N, Pavlovic T. Risk factors for breast cancer: is ionizing radiation among them? *J BUON*. 2008; 13:487-94.

Gronwald J, Cybulski C, Piesiak W et al. Cancer risks in first-degree relatives of CHEK2 mutation carriers: effects of mutation type and cancer site in proband. *Br J Cancer*. 2009; 100(9): 1508-12.

Gyuton AC, Hall JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. In: Hemácias, Leucócitos e Resistência do Corpo à Infecções. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p247-58.

Hall JM. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250 (4988): 1684-1689, 1990.

Harbeck N, Pegram MD, Rüschoff J et al. Targeted Therapy in Metastatic Breast Cancer: The HER2/neu Oncogene. *Breast Care (Basel)*. 2010; 5(s1):3-7.

Hejna JA, Timmers CD, Reifsteck C, et al. Localization of the Fanconi anemia complementation group D gene to a 200-kb region on chromosome 3p25.3. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1540-1551.

Ho BC, Tan PH. Lobular neoplasia of the breast: 68 years on. *Pathology* 2009; 41(1): 28-35.

Holland DW, Boucher LD, Mortimer JE. Tubular breast cancer experience at Washington University: a review of the literature. *Clin Breast Cancer*. 2001; 2(3):210-4.

Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT et al. High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res*. 2009; 69(8):3625-33.

Howlett NG, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in fanconi anemia. *Science* 2002; 297: 606-9.

Hsiao YH, Chou MC, Fowler C et al. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. *J Cancer* 2010; 1:6-13.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38:103-113.

IFAR - International Fanconi Anemia Registry - Instituto Rockefeller - NY.

Inca - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 26 ago. 2005.

Janz NK, Mujahid MS, Hawley ST et al. Racial/ethnic differences in quality of life after diagnosis of breast cancer. *J Cancer Surviv* 2009; 3:212-22.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2000; 10:157-61.

Johnson N, Fletcher O, Palles C et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2007; 16(9): 1051-7.

Kachnic LA, Li L, Fournier L et al. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxilplatin treatments. *Cancer Lett* 2010; 292:73-9.

Kalb R, Neveling K, Hoehn H et al. Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia prtein, FANCD2, sustain a significant group FA-D2 patientes with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 2007; 80:895-910.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15:36-47.

Kono S. Host and environmental factors predisposing to cancer development. *Ryoho*. 2010; 37:571-6.

Kreiger N, Sloan M, Cotterchio M, Kirsch V. The risk of breast cancer following reproductive surgery. *Eur J Cancer* 1999; 35:97-101.

Kutler DI, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003; 101(4):1249-56.

Lea CS, Gordon NP, Prebil LA et al. Differences in reproductive risk factors for breast cancer in middle-aged women in Marin County, California and a sociodemographically similar area of Northern California. *BMC Womens Health*. 2009; 25: 9:6.

Leonard GD, Swain SM. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(12):906-20.

Lewis BJ, Conry RM. Câncer de mama. In: Benett JC, Plum F. *Cecil Tratado de medicina interna*. 20^a ed, v. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1461-66.

Lewis AG, Flanagan J, March A, Pupo GM, Mann G et al. Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH, LMO4 and SFN I familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(6):1005-1016.

Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*. 2004;103:2498-503.

Lev-Schelouch D, Sperber F, Gat A et al. Paget's disease of the breast. *Harefuah* 2003; 142(6):433-7, 485.

Li FP. Identification and management of inherited cancer susceptibility. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 8:297-300.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 1046-52.

Lidereau R. Major improvement in the efficacy of BRCA1 mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. *Cancer Res*, 60: 1206-10, 2000.

Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2010; 329:693-6.

Lo YF, Cheung YC, Hsueh S, Ho KC. Feasibility of sentinel lymph node biopsy in multifocal/multicentric breast cancer. *Chang Gung Med J*. 2009; 32:51-8.

Lof M e Weiderpass E. Impact of diet on breast cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009; 21:80-5.

Lu KH. Hereditary gynecologic cancers: differential diagnosis, surveillance, management and surgical prophylaxis. *Fam Cancer*. 2008; 7:53-8.

Lynch HT. Clinical/genetic features in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15(2): 63-71.

Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA et al. Adjuvant/neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2008; 34(6):539-57.

Malyuchik SS, Kiyamova RG. Medullary breast carcinoma. *Exp Oncol* 2008; 30(2):96-101.

Martin D, Austin H. An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. *Epidemiology* 1991; 2:359-362.

McKenzie F, Jeffreys M, 't Mannetje A et al. Prognostic factors in women with breast cancer: inequalities by ethnicity and socioeconomic position in New Zealand. *Cancer Causes Control* 2008; 19(4):403-11.

McPherson K, Stul CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer - epidemiology, risks factors and genetics. *RMJ* 2000; 321:624-28.

McTiernan A, Irwin M, Vongruenigen V. Weight, physical activity, diet, and prognosis in breast and gynecologic cancers. *J Clin Oncol*. 2010; 28:4074-80.

Melchor L, Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 2008; 29(8):1475-82.

Meetei AR et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 2003b; 23: 3417-26.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004; 36:1219-24.

Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; [Epub ahead of print].

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002; 31:55-9.

Melchor L, Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*. 2008; 29(8):1475-82.

Memis A, Ozdemir N, Parildar M et al. Mucinous (colloid) breast cancer: mammographic and US features with histologic correlation. *Eur J Radiol* 2000; 35(1):39-43.

Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol* 2005; 18(8):1067-78.

Mokbel K, Cutuli B. Heterogeneity of ductal carcinoma in situ and its effects on management. *Lancet Oncol* 2006; 7(9):756-65.

Moldovan GL, D'Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*. 2009; 43:223-49.

Montazeri A. Quality of life data as prognostic indicators of survival in cancer patients: an overview of the literature from 1982 to 2008. *Health Qual Life Outcomes*. 2009; 23: 7:102.

Moros MT, Ruidiaz M, Caballero A et al. Effects of an exercise training program on the quality of life of women with breast cancer on chemotherapy. *Rev Med Chil*. 2010; 138(6):715-22.

Muggerud AA, Hallett M, Johnsen H et al. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(4):357-68.

Mujahid MS, Janz NK, Hawley ST et al. Racial/ethnic differences in job loss for women with breast cancer. *J Cancer Surviv* 2010; [Epub ahead of print].

Nagar S. Pharmacokinetics of anti-cancer drugs used in breast cancer chemotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 678:124-32.

Nakanishi, K. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 2002; 4:913-20.

Narod SA, Feunteun J, Lynch HT et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991; 338(8759): 82-83.

Narod SA. BRCA1 and BRCA2 in 2005. *Discov Med* 2005; 5(25):50-4.

Nath-Sain S, Marignani PA. LKB1 catalytic activity contributes to estrogen receptor alpha signaling. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(11):2785-95.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; 10(6):515-27.

Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(2):121-36.

Ng AK, Travis LB. Radiation therapy and breast cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009; 7:1121-8.

Organização Mundial da Saúde, 2010; <http://www.who.int/en/>.

Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer* 2008; 113(7):1511-20.

Palagyi A, Neveling K, Plinninger U et al. Genetic inactivation of the FA gene in the hepatocellular carcinoma cell line HUK-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer* 2010; 9:127.

Parker SJ, Harries SA. Phyllodes tumours. *Postgrad Med J* 2001; 77(909):428-35.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 1999; 49:33-64.

Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ. Mouse models of Fanconi anemia. *Mutat Res* 2009; 668(1-2): 133-40.

Patani N, Cutuli B, Mokbel K. Current management of DCIS: a review. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111(1):1-10.

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

Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L et al. Estrogens, progestogens, abnormal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993; 15:17-35.

Pierce JP, Natarajan L, Cnaan BJ et al. Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial. *JAMA*. 2007; 298:289-98.

Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex* 2009; 51 Suppl 2:s141-6.

Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5(9):531-42.

Privat M, Aubel C, Arnould S et al. Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379(3):785-9.

Prochazka M, Hall P, Granath F et al. Family history of breast cancer and young age at diagnosis of breast cancer increase risk of second primary malignancies in women: a population-based cohort study. *Br J Cancer*. 2006; 95(9):1291-5.

Racz MM, Pommier RF, Troxell ML. Fine-needle aspiration cytology of medullary breast carcinoma: report of two cases and review of the literature with emphasis on differential diagnosis. *Diagn Cytopathol* 2007; 35(6):313-8.

Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, et al. Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2007; 39:165-7.

Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME et al. The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 2009; 45(10):1780-7.

Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori.* 2008; 94(3):370-83.

Reliene R, Yamamoto ML, Rao PN et al. Genomic instability in mice is greater in Fanconi anemia caused by deficiency of *FANCD2* than *FANCG*. *Cancer Res* 2010; 70:9703-10.

Reis-Filho JS, Pinder SE. Non-operative breast pathology: lobular neoplasia. *Clin Pathol* 2007; 60(12):1321-7.

Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology* 2008; 75(2): 140-8.

Robson M. CHEK2, breast cancer, and the understanding of clinical utility. *Clin Genet.* 2010; 78(1): 8-10.

Rodriguez DEA. Estudo molecular da Anemia de Fanconi. 2003. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas.

Rogowski WH, Grosse SD, Khoury MJ. Challenges of translating genetic tests into clinical and public health practice. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(7):489-95.

Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353(16):1673-84.

Rugo HS. The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors. *Ann Oncol* 2008; 19:16-27.

Russo J, Hu YF, Yang X et al. Developmental, cellular and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 5:17:37.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:6230-4.

Sakorafas GH, Blanchard K, Sarr MG et al. Paget's disease of the breast. *Cancer Treat Rev* 2001; 27(1):9-18.

Sakorafas GH, Farley DR, Peros G. Recent advances and current controversies in the management of DCIS of the breast. *Cancer Treat Rev* 2008; 34(6):483-97.

Saxena NK, Sharma D. Metastasis suppression by adiponectin: LKB1 rises up to the challenge. *Cell Adh Migr*. 2010; 4(3):358-62.

Scheuner MT, McNeel TS, Freedman AN. Population prevalence of familial cancer and common hereditary cancer syndromes. The 2005 California Health Interview Survey. *Genet Med*. 2010; [Epub ahead of print].

Schmitt E, Dekant W, Stopper H. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicol In Vitro* 2001; 15:433-9.

Schmitt M, Lazar V. Cancer-related forecast biomarkers: a topic in focus of the Worldwide Innovative Network in Personalized Cancer Medicine (WIN). *Bioanalysis*. 2010; (5):851-3.

Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontane chromosomen aberrationen bei familiärer panmyelopathie. *Humangenetik* 1964; 1:194-6.

Schwartz RA, Wiederkehr M, Lambert WC. Secondary mucinous carcinoma of the skin: metastatic breast cancer. *Dermatol Surg* 2004; 30(2 Pt 1):234-5.

Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P et al. Evaluation of FA genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Res* 2003; 63:8596-99.

Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196(1):65-80.

Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 2002;100:4649-54.

Shirley SH, Rundhaug JE, Tian J et al. Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69(8):3405-14.

Shulman LP. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010; 37:109-33.

Sims AE, Spiteri E, Sims RJ 3rd et al. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:564-567.

Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*. 2007; 129:289-301.

Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG et al. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 107(3):309-30.

Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. In: Atwater SK. *Neoplasias do Sistema Imune*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.502-23.

Strathdee, CA, Duncan AMV, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet*. 1992; 1: 196-198.

Stewart G, Elledge SJ. The two faces of BRCA2, a FANCTastic discovery. *Mol Cell*. 2002; 10:2-4.

Takahashi A, Yamamoto A. Diagnosis and treatment of extramammary Paget's disease. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2004; 31:356-9.

Taliaferro-Smith L, Nagalingam A, Zhong D et al. LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009; 28(29): 2621-33.

Taniguchi T, Dandrea AD. Molecular pathogenesis of fanconi anemia. *Int J Hematol*. 2002; 75:123-8.

Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. 2002; 109:459-72.

The Rockefeller University NY 2010; www.rockefeller.edu/fanconi/mutate.

Timmers C et al. Positional cloning of a novel Fanconi Anemia Gene, FANCD2. *Molecular Cell* 2001; 7:241-48.

Tischkowitz M, Easton DF, Ball J, Hodgson SV, Mathew CG. Cancer incidence in relatives of British Fanconi Anaemia patients. *BMC Cancer* 2008; 8:257.

Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9:321-45.

Untch M, Thomssen C. Clinical practice decisions in endocrine therapy. *Cancer Invest* 2010; 1:4-13.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 71:432-8.

Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ et al. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007; 7:153.

Van Der Heijden MS et al. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63(5):1585-2588.

Virnig BA, Tuttle TM, Shamliyan T et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(3):170-8.

Vona-Davis L, Rose DP. The influence of socioeconomic disparities on breast cancer tumor biology and prognosis: a review. *J Womens Health* 2009; 18:883-93.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human Mutation* 2001; 17: 439-474.

Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*. 2007; 11(2):103-5.

Wang K, Ye Y, Xu Z et al. Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 200(1): 40-6.

Wang X, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004; 3:1063-69.

Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C et al. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol*. 2008; 26(4): 542-8.

Willard HF, Angrist M, Ginsburg GS. Genomic medicine: genetic variation and its impact on the future of health care. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360(1460):1543-50.

Woodhead JL. Alternative methodology of genes diagnosis. In: Davies, KE. *Humangenetics disease - a practical approach*. Oxford: IRL Press Limited, 1986, p. 51-54.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265: 2088-90, 1994.

Yuan F, El Hokayem J, Zhou W et al. FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *J Biol Chem* 2009; 284(36):24443-52.

Zandrino F, Calabrese M, Faedda C et al. Tubular carcinoma of the breast: pathological, clinical, and ultrasonographic findings. A review of the literature. *Radiol Med.* 2006; 111(6): 773-82.

Zdzienicka MZ, Arwert F. Breast cancer and Fanconi anemia: what are the connections? *Trends Mol Med.* 2002; 8(10):458-60.

Zhang R, Chen HJ, Wei B et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chin Med J (engl)* 2010; 123(15):1976-82.

Zhang X, Li J, Sejas DP et al. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *The journal of Biological Chemistry* 2004; 279:43910-19.

8- ANEXOS

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
ARMAZENAMENTO DE SANGUE E ANÁLISE**

Prezada paciente,

Este projeto de pesquisa pretende estudar a partir de investigação em biologia molecular a influência familiar e pessoal para desenvolver câncer de mama. O método utilizado são os mesmos da prática clínica do dia-a-dia e você não será submetida a nenhum exame que venha a lhe causar dano.

Caso você queira participar do estudo, na sua consulta médica será feita um entrevista e será coletado uma amostra de seu sangue para investigar a possibilidade de você ter um câncer de mama relacionado a influências nos seus genes. Se você se interessar, você será informada dos resultados deste estudo, embora eles não vão modificar o seu tratamento, mas talvez sejam importantes para outras pessoas de sua família.

Todos os dados colhidos a seu respeito serão mantidos em segredo pelos pesquisadores.

É dada a liberdade da senhora de não participar a qualquer momento deste estudo, não havendo nenhuma alteração ou prejuízo no seu atendimento. Caso você queira participar, por favor, assine este documento e entregue ao seu médico no momento da consulta. Se você possuir alguma dúvida, sinta-se a vontade para perguntar.

Sendo assim, assine abaixo confirmando que a senhora leu e compreendeu o que lhe foi exposto, aceitando participar do estudo.

A- Eu,_____
dou consentimento para que uma amostra do meu sangue seja analisada para
_____. Se não for possível de momento efetuar o teste,
a minha amostra será armazenada até que um teste apropriado seja
desenvolvido.

Eu compreendo que para o desenvolvimento e padronização de novos
testes poderá ser necessário utilizar parte da minha amostra anonimamente.
Se quaisquer benefícios comerciais surgirem destes estudos, compreendo que
eu pessoalmente não os reclamarei.

Assinatura_____Data_____

B- Eu gostaria/não gostaria de ser informada dos resultados do meu teste (riscar
como apropriado).

C- Os resultados do meu teste podem permitir que outros membros da família
beneficiem de teste genético. Dou consentimento para que a informação
genética que pode ser importante para outros membros da família se torne
disponível aos médicos.

Assinatura_____Data_____

FICHA DE COLETA DE DADOS

**Título do projeto: ANÁLISE DO COMPLEXO *FANCI/FANCD2* EM MULHERES
BRASILEIRAS COM CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO**

1- Dados pessoais:

Número do caso: _____ Matrícula(HC): _____

Nome: _____ Fone: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Nacionalidade: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Data da entrevista: ____/____/____

2- Informações clínicas pessoais:

Carcinoma de Mama: ☐ Sim ☐ Não

Carcinoma Bilateral: ☐ Sim ☐ Não

Outro Carcinoma: ☐ Sim ☐ Não

☐ Ovário ☐ Colo ☐ Próstata ☐ Outros _____

Exposição a agentes mutagênicos:

☐ Radiação

☐ Agentes químicos

Ingestão de bebida alcoólica: ☐ Sim ☐ Não

Frequência: _____

Fumante: ☐ Sim ☐ Não

Frequência: _____

Uso de contraceptivos orais ou fármacos com dosagens altas de estrogênio:

☐ Sim ☐ Não

Quanto tempo? _____

Tratamento para reposição hormonal:

☐ Sim ☐ Não

Tratamento para infertilidade:

☐ Sim ☐ Não

Possui filhos: ☐ Sim ☐ Não

Quantos? _____.

Idade da 1ª (____) e última gestação (____)

3- Informações clínicas familiares:

Familiares com carcinoma de mama: () Sim () Não

Grau de parentesco:

1º grau: () mãe () pai () irmã () irmão () filha (o)

2º grau: () vô () vó () tio (a) () primo (a) () neto (a)

3º grau _____ Quantos? _____

Familiares com outro carcinoma: () Sim () Não

Qual? _____

Consanguinidade: Quem? _____

4- Heredograma:

5- Observações: _____

6- Laudo anátomo-patológico:

Número do Exame _____ Emissão | _ | _ | _ | _ | _ |

Exame microscópico:

Tipo histológico predominante

- () Ca ductal *in situ*
- () Ca lobular *in situ*
- () Doença de Paget do mamilo sem tumor associado
- () Ca ductal invasivo
- () Ca ductal invasivo com componente intraductal predominante
- () Ca lobular invasivo
- () Ca tubular
- () Ca mucoso(colóide)
- () Ca medular
- () Ca papilífero
- () Ca inflamatório
- () Outro _____

Subtipo histológico do carcinoma intraductal:

- () Comedo () Cribiforme
- () Intracístico () Micropapilífero
- () Sólido () Papilífero () Aderente *clinging* () Não avaliável
- () Outro _____

Gradação (do carcinoma invasivo e *in situ*):

() Grau 1 () Grau 2 () Grau 3 () Não aplicável

7- Laudo imunoistoquímico:

Número do Exame | _____ | Emissão | _ _ _ _ _ |

Receptores estrogênicos () Positivo () Negativo

Expressão da proteína c-erb-B2 () Positivo () Negativo

Observações:

8- Análise Molecular:

- *FANCI*

165C>T () PRESENTE () AUSENTE

261C>T () PRESENTE () AUSENTE

866C>T () PRESENTE () AUSENTE

1264G>C () PRESENTE () AUSENTE

1686C>G () PRESENTE () AUSENTE

184C>T () PRESENTE () AUSENTE

2058C>A () PRESENTE () AUSENTE

2226G>C () PRESENTE () AUSENTE

2248T>C () PRESENTE () AUSENTE

3321T>G () PRESENTE () AUSENTE

3453C>T () PRESENTE () AUSENTE

3666C>T () PRESENTE () AUSENTE

-FANCD2

376A>G () PRESENTE () AUSENTE

782A>T () PRESENTE () AUSENTE

958C>T () PRESENTE () AUSENTE

958C>T () PRESENTE () AUSENTE

DEL17 () PRESENTE () AUSENTE

1948-6C>A () PRESENTE () AUSENTE

2444G>A () PRESENTE () AUSENTE

3707G>A () PRESENTE () AUSENTE

3803G>A () PRESENTE () AUSENTE

- Sequenciamento automático:

Resina 222 (P) () PRESENTE () AUSENTE Qual? _____

LISINA 561(ub) () PRESENTE () AUSENTE Qual? _____

PREENCHIDO PELO MÉDICO:

Eu, _____,
expliquei ao doente acima referido o objetivo de obter uma amostra de sangue
para estudos genéticos.

Assinatura _____ Data _____

Sequência de primers, temperatura de anelamento, tamanho do fragmento amplificado e temperatura para análise do gene *FANCD2* (Lewis et al., 2005)

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
1	GGTGAGCCCAGCTT ATTGC	GCCTCGAGAGACTACG ACCA	55	188	64
2	CTTCAGCAACAGCGA AGTAGTCCTG	GATTCTCAGCACTTGA AAAGCAGG	50	421	56
3	GGACACATCAGTTTT CCTCTC	GAAAACCCATGATTCA GTCC	50	308	56
4 e 5	TCATCAGGCAAGAAA CTTGG	GAAGTTGGCAAAACAG ACTG	50	466	53, 58
6	GAGCCATCTGCTCAT TTCTG	CCCGCTATTTAGACTT GAGC	50	282	56
7	CAAAGTGTTTATTCC AGGAGC	CATCAGGGTACTTTGA ACATTC	50	342	55, 60
8	GACCAGAAAGGCTC AGTTCC	CTGCAGCACATTACCC AGAA	55	463	51, 56
9	CAGCTCTGCATTTCA CACGTA	TGCAGTGATAGAACCC CCATA	55	265	60, 62
10	TGCCCAGCTCTGTTC AAACC	AGGCAATGACTGACTG ACAC	50	219	59
11	TGCCCCGTCTATTTTT GATGAAGC	TCTCAGTTAGTCTGGG GACAG	50	391	56
12	TCATGGTAGAGAGAC TGGACTGTGC	ACCCTGGAGCAAATGA CAACC	55	432	53, 58
13	ATGGCAGGAACTCC GATCTT	CCTTATTCAGCATGCC CTGT	55	363	56
14	GGGCATGCTGAATAA GGTGT	GACAGTGGGAAGGCAA GCTA	55	189	57

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
15	GGGAGTGTGTGGAA CAAATGAGC	AGTTTCTACAGGCTGG TCCTATTCC	50	513	56
16	AACGTGGAATCCCAT TGATGC	TTTCTGTGTTCCCTCCT TGC	58	378	57
17	GATGGTCAAGTTACA CTGGC	CACCTCCCACCAATTA TAGTATTC	54	381	57
18	CTATGTGTGTCTCTT TTACAGGG	AATCTTTCCCACCATAT TGC	50	233	52, 57
19	CATACCTTCTTTTGC TGTGC	CCACAGAAGTCAGAAT CTCCACG	48	198	59
20	ACACACCGGGGAAT GTTGT	CTGCAGGTTGGGTGAC AGAG	53	341	49, 54, 59
21	GAGTTTGGGAAAGAT TGGCAGC	TGTAGTAAAGCAGCTC TCATGC	54	231	59
22	ACACTCTGCACTGCC CTTTT	GAAAGAAGCTGTGGGA CTGG	55	239	60
23	TGGTTTTCCCTGTAG CCTTG	CTCAACTTCCCCACCA AGAG	55	294	60
24	TTGTGTTCCCTATGT ATGTGGAG	TTGATCTGCCCTTTCC CTAA	54	269	58
25	CAGCTAGCTCCAGA GGCAAC	TGCACAATAAGTGAAA CATCCT	54	229	58
26	TTCATAGACATCTCT CAGCTCTG	GTTTTGGTATCAGGGA AAGC	52	283	52, 57
27	GCCATGCTTGGTAAT TTTGG	TTCCAATTACTGATGCC ATGAT	55	319	57
28	TTGTTTTCTGAGGGC AATGA	TGGGATGTCACAAACC TTCA	55	230	52, 57
29	GGTCTTGATGTGTGA CTTGTATCCC	CCTCAGTGTACAGTG TTCTTTGTG	58	446	51, 56

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
30	CATGAAATGACTAGG ACATTCC	CTACCCAGTGACCCAA ACAC	52	280	60
31	GACTCCATTGCGAAC CCTTA	CAGCCAAAAATGAAAC CTCA	55	260	58
32	TGAGGTTTCATTTTT GGCTGA	GTGCCTTGGTGACTGT CAAA	55	268	58
33	TTGATGGTACAGACT GGAGGC	AAGAAAGTTGCCAATC CTGTTCC	50	273	58
34	AGCACCTGAAAATAA GGAGG	GCCCAAAGTTTGTAAG TGTGAG	52	342	52, 57
35	TGTTAGACCGGGAAC GTCTT	TTGGCTCATTGGAAGA AACC	55	257	54, 59
36	TCTTCCAATGAGCCA AATAGC	CCCAGCCTGATGATGA TTCT	55	450	58
37	AGAGGTAGGGAAGG AAGCTAC	CCAAAGTCCACTTCTT GAAG	50	232	60
38	GATGCACTGGTTGCT ACATC	CCAGGACACTTGTTTT CTGC	52	274	58
39	ACACTCCCAGTTGGA ATCAG	CTTGTGGGCAAGAAAT TGAG	54	369	54, 59
40	TGGGCTGGATGAGA CTATTC	CCAAGGACATATCTTC TGAGCAAC	52	222	59
41	TGATTATCAGCATAG GCTGG	GATCCCCCAATAGCAA CTGC	52	270	54, 59
42	CATTCAGATTCACCA GGACAC	CCTTACATGCCATCTG ATGC	54	226	59
43	AACCTTCTCCCCTAT TACCC	GGAAAATGAGAGGCTA TAATGC	52	434	58
44	TGTATTCCAGAGGTC ACCCAGAGC	CCAGTAAGAAAGGCAA ACAGCG	59	234	58

Sequência de primers, temperatura de anelamento, tamanho do fragmento amplificado e temperatura para análise do gene *FANCI*

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
1	CACCCCTTCAGTCTTCAT GG	CTCCTTTCCCCACAGAAC	60	575	61
2	CACCCACCTCTGACGTTT TT	TGGGGAGTAGATGAAGAAG CA	59	593	60
3	GGACACATCAGTTTTCTT CTC	GAAAACCCATGATTGAGTC C	51	535	54
4	TCATCAGGCAATCGGTAT GC	GAAGTTGGCAAAACAGACT G	58	487	52
5	TCGCCAATTGCTACTATCT A	TGCGTAACGTGTACCTGTA AT	55	445	51
6	AACCTGTAGTCAGGTGT CCA	CCTGTGCATGGTGTCTCTG	57	382	57
7	CCTGTGACACTGTCTGTC AT	TTGTGCACACTGTGCTTA	60	456	55
8	GACCAGAAAGGCTCAGTT CC	CCTGTGCACTTTGTGCAC	57	453	58
9	CCTGTACTGTCATTGCTGT	TTGCACAATGCTGCATTG CA	54	337	62
10	AATCGGTGACTAGTAGGT GA	AGGCAATGACTGACTGACA C	53	335	58
11	TTAGTATACCTTGATACAT AGT	TTAGGCATAGACTGATCTG A	50	386	55
12	TTAGAATGCATAGTACATG AA	TAGCTTAAGCATAGACTGA CT	54	432	51
13	TTATTAGCGGTAGATAGA CA	CCATAGCTTAGCATGACT	48	431	54
14	TTAGGTAAGTATCGTAC GT	ATGCGTCATGTGCCTAAAC TG	55	235	57

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
15	GGTACCTAGCTTGACACT GC	ATGCTTGACTGTGCAATGC A	47	478	55
16	TTATGTCTGACTGTAAGT C	TTTCTGTGTTCCCTCCTTGC	54	380	57
17	ATTGCTTGTTACGCGAAT GC	TTATTGGTCTAGCATTGAT	53	458	55
18	TAGTGACGTGCAATGAG ACT	TAGCTGATCCCATGACTGG	49	260	52
19	TTAGATAACGTACGTGCC AT	ATGTACCATGCATGTTTCCAG T	56	235	59
20	TGGTTTTCCCTGTAGCCTT G	TAGTTACCGTTAACGTGCG T	54	356	59
21	GAAAGAAGCTGTGGGACT GG	TTAGCTAAGCAGCTCTCTG	54	231	59
22	ATGCTTACGATACGTTAC GT	TTAGCTACCGTTAGCGTA	55	356	61
23	ATTAACAGATAGACAGATA G	ATAGCATAGCAGATAGC	54	394	55
24	TATGCGTAATGGCGATAG GC	ATGCAATTGGACCTAGCG	57	369	55
25	TAGCATGACGGATGGAGA GC	ATGGCAGTAGGTAGGGAT	57	521	58
26	TTAGTGGACAGCGAGGTA GC	GGTAGGGACGTGAAGAAA	52	290	61
27	ATGGACGCATGATCCGTA GGC	ATTAGTGCAGTGGAGGCGC C	53	356	57
28	ATTGCGCCATGAGGGGGA TCG	ATGACGATCCATGACCCAC T	58	346	52
29	AACGTGATGCGCAGGGGA TGC	ATGCTAAAACGTGTACGTG C	57	449	56

Exon	Primer forward	Reverse	Anelamento	pb	Seq (T°C)
30	CATGAAATGACTAGGACA TTC	ATGCTAGCTGAGTGATACG T	52	476	60
31	ATAGCGATTAGCAGTAGC GTG	ATGATGCGATAGCTTAGCG T	55	356	55
32	ATTTGACGTGCGCGATTG ATG	ATGTAGCGATGCGTGCATG C	59	540	59
33	ATTGACAGTGGATGCAGT AGC	ATGTACGTAGGCGATGCTG T	53	489	58
34	ATGCAGGTAGGATAGTGA TCG	GATGACCCGTGCGCATGC GGG	56	458	52
35	ATGCAGGATGAATGACGC GAGT	ATGGCGATTAGCGCATGCG AT	55	357	59
36	ATGCAGTGACGATGCGAT CTAG	ATGCAGTGGCGATGCGATG T	56	457	60
37	ATGACGATAGCGATATAC GTAT	ATGCAGTGAGTACGCATGA CA	49	232	60