

RAFAEL SOUZA QUEIROZ

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO S707P NO GENE *ATM* EM
PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA**

CAMPINAS

2005

RAFAEL SOUZA QUEIROZ

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO S707P NO GENE *ATM* EM
PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2005

ADÉ	BC
AMADA	T/UNICAMP
	Q32a
EX	
30 BC/	66857
	16.123-06
C	☒
D	☒
DO	14.09
A	9/2/06
PD	

ibid 374766

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Q32a

Queiroz, Rafael Souza

Análise da mutação S707P no gene *ATM* em pacientes portadoras de câncer de mama. / Rafael Souza Queiroz. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Carmen Silvia Bertuzzo

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Reação em cadeia da polimerase. 2. Genótipo. 3. Câncer. 4. Câncer - mamas. 5. Biologia molecular. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Membros:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. Carlos Steiner

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 23/08/2005

Trabalho realizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Apoio financeiro Capes

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Maria das Graças e Ricardo Denis,
por estarem comigo mesmo quando não concordavam.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela orientação, amizade e confiança ao longo desses anos;

A Profa. Dra. Cristine Haeckel, pela ajuda e incentivo;

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Zeferino, pela colaboração e incentivo;

A Érika e Luciana, pela recepção, dedicação e paciência ao me ensinar e, sobretudo por sua amizade;

A Amanda Olívia e Daniela Furgeri, pela ajuda na execução da metodologia e amizade;

Aos amigos, Cyntia, Leonardo e Anderson pela amizade, ajuda, convivência agradável e descontração;

A Fábio Rossi Torres, por sua disposição em ajudar, em ensinar e pela amizade;

A Rafael Marchesini, Daniel Elder, Claudia, Maria Cristina, Rodrigo, Lillian, Henry, Jossimar, Marilza, Jair, pela ajuda, amizade e convívio;

Aos meus colegas de laboratório pelo convívio alegre e ajuda durante esses anos;

Aos meus pais Maria das Graças e Ricardo Denis e ao meu irmão Ricardo, pela paciência, amor, compreensão e sustento, mesmo nos momentos mais difíceis.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xiv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO.....	18
O Câncer.....	19
O Câncer de Mama no Brasil.....	19
A Genética do Câncer de Mama.....	23
Proteína ATM.....	23
ATM no maquinário de respostas a danos no DNA.....	25
Ponto de Checagem G1/S.....	26
Ponto de Checagem da Fase S.....	28
Ponto de Checagem G2/M.....	29
Mutação em ATM.....	30
Mutações em ATM x Câncer de Mama.....	34
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	36
Justificativa.....	37
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
1- Casuística.....	39
1.1- Critérios de Inclusão para indivíduos dos grupos I e II.....	40
1.2- Critérios de Inclusão para indivíduos do grupo controle.....	40
2- Métodos.....	41
2.1- Extração de DNA com Fenol.....	41

2.2- Análise de mutação.....	41
2.2.1- Reação em Cadeia da Polimerase.....	41
2.2.2- Restrição com Endonuclease.....	42
RESULTADOS.....	43
Avaliação dos genes BRCA1 e BRCA2.....	45
Avaliação do gene ATM.....	46
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

53BP1	“p53 BINDING PROTEIN 1”
AP-2	“Adaptor-Related Protein 2”
AT	Ataxia Telangiectasia
ATDC	Ataxia Telangiectasia grupo de complementação D
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutado
ATR	Ataxia Telangiectasia Relacionado
BASC	“BRCA1-associated genome surveillance complex”
Beta-NAP	“Adaptor-related protein neuronal adaptin”
BLM	Síndrome de Bloom
BRCA1/BRCA2	“Breast Cancer gene 1 e 2”
C CA/ S HIS	Com câncer e sem histórico
C CA/ C HIS	Com câncer e com histórico
CDC25A/CDC25C	“Cell Division Cycle 25A e 25C”
Cdk2	Quinase de ciclina dependente 2
cDNA	DNA complementar
Cds	CDP-Diacilglicerol Sintase
CHK1/Chk1/CHK2/CHEK2/Chk2	Gene da Quinase de Ponto de Checagem 1 e 2
CTIP	“CTBP-Interacting Protein”
DNA	Ácido desóxiribo nucléico
dNTP	desoxinucleotídeo tri fosfato
Eco8II	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra acético

<i>FANCD2</i>	Anemia de Fanconi grupo de complementação D2
<i>GADD45</i>	“Growth Arrest- And Dna Damage-Inducible Gene”
H2AX	Histona
Hus1	Gene Hidroxiurea-Sensível 1
MDC1	“Mediator of Dna Damage Checkpoint Protein 1”
MLH1	Homólogo de MutL, <i>E. coli</i> , 1
MRE11	“Meiotic Recombination 11”
MRN	Complexo proteico MRE11-RAD50-NBS1
MSH2/MSH6	Homólogo de MutS, <i>E. coli</i> , 2 e 6
<i>NAT1</i>	N-Acetyltransferase 1
<i>NBS1</i>	Gene <i>NIBRIN</i>
p53/TP53	“Tumor Protein p53”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKC	“Paroxysmal Kinesigenic Choreoathetosis”
PTEN	“Phosphatase And Tensin Homolog”
<i>RB</i>	Retinoblastoma
<i>RFC/RFC1/RFC2/RFC4</i>	“Replication Factor C”
RPA	“Replication Protein A”
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polimerase
TE	Tris EDTA

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Resultados obtidos nos três grupos analisados.....	46
Tabela 2- Frequência alélica comparativa com o grupo controle do estudo de DÖRK <i>et al.</i> , 2001 (Alemanha).....	52

	PÁG.
Figura 1- Pontos de checagem de danos no DNA.....	24
Figura 2- Maquinário de ação de resposta a danos no DNA.....	26
Figura 3- Ponto de checagem G1/S ATM dependente.....	27
Figura 4- Ponto de checagem ATM dependente da fase S.....	28
Figura 5- Ponto de checagem G2/M ATM dependente.....	30
Figura 6- histograma do cromossomo 22 com o locus do ATM.....	31
Figura 7- Representação do número amostral analisado.....	44
Figura 8- Distribuição das amostras em relação à idade.....	45
Figura 9- Gel de Agarose demonstrando a análise da mutação S707P do gene <i>ATM</i> com controle de digestão.....	46
Figura 10- Gel de Agarose demonstrando a análise da mutação S707P do gene <i>ATM</i> com heterozigotos para S707P.....	48

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Critérios utilizados nos estudos genéticos e moleculares correlacionados ao câncer de mama com importante etiologia genética.....	22
Quadro 2- Mutações no gene <i>ATM</i>	33

RESUMO

No Brasil, o câncer de mama é o maior causador de mortes entre as mulheres. O histórico familiar constitui o fator de risco mais importante na determinação do câncer de mama familiar. Estima-se que cerca de 5 a 10% dos tumores de mama sejam hereditários. Vários genes são relacionados como responsáveis pelo câncer de mama familiar, dentre estes deve-se citar o gene *ATM*, que codifica uma proteína do tipo quinase de ponto de checagem que harmoniza o reconhecimento de alterações no DNA oriundas de radiação ionizante.

Vários estudos demonstram a associação entre a mutação S707P do gene *ATM* e câncer de mama. O objetivo deste estudo é verificar a presença da mutação S707P no gene *ATM* em uma amostra de pacientes portadores de Câncer de mama e relacioná-la com a apresentação clínica da doença e o grau histológico. Para isso, esse estudo utilizou a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase seguida por digestão enzimática. Foram analisados 221 indivíduos para a mutação S707P, sendo 50 indivíduos com câncer e com histórico, 49 indivíduos com câncer sem histórico e 122 indivíduos do grupo controle. Somente dois indivíduos apresentaram a mutação S707P, sendo ambos em heterozigose do grupo controle (0,01). Esse é o primeiro estudo no Brasil que procura associação de mutações no gene *ATM*, em especial a mutação S707P com o câncer de mama hereditário e esporádico. Nenhuma associação foi encontrada entre a mutação S707P do gene *ATM* e o câncer de mama, tanto em mulheres com histórico familiar quanto em portadoras de câncer de mama esporádico.

ABSTRACT

Introduction In Brazil, breast cancer is the most responsible for death in women. Familiar history is the most important risk factor to establish familial breast cancer because about 5 to 10 % of breast tumors have a genetic etiology. Many genes are involved in familial breast cancer responsible, like *ATM*. The *ATM* gene encodes a checkpoint kinase protein which recognizes DNA damage by ionizing radiation. Epidemiological evidence suggests that *ATM* heterozygotes, representing 0.5-1% of the general population, have a 5 to 8-fold increased risk of developing breast cancer. However, direct molecular analysis of *ATM* in selected breast cancer patients outside AT families has led to conflicting results. The aim of this study was to verify in a sample of 99 breast cancer carriers, the S707P missense alteration in *ATM* gene comparing with a control group of 122 individuals.

Methods Polimerase chain reaction was performed followed by RFLP to identify S707P mutation.

Results We found two heterozygotes for S707P mutation in control group only. No homozygotes were detected. The comparison with histologic degree was not possible. The allelic frequency in control group were 0,01% and genotype frequency of 0,016 or 1,6 %. This is the first study in Brazilian patients with breast cancer and *ATM* mutations. Ours results show that breast cancer is not associated with S707P mutation of *ATM* gene in this population.

Conclusion Any link between S707P and breast cancer was observed, even in familial and non familial history breast cancer carriers. Our study is limited by its small number of mutations, therefore, new studies with more mutations are necessary.

INTRODUÇÃO

O Câncer

Câncer é a denominação dada a um conjunto de diversas doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. O câncer é considerado maligno quando se espalha por meio de metástase para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores devido ao acúmulo de células cancerosas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplica vagarosamente e se assemelha ao seu tecido de origem, raramente constituindo um risco de vida (ALBERTS *et al.*, 1997; LEWIS & CONRY, 1997; CRUM, 1996).

O câncer de mama ocorre com maior frequência em mulheres do que em homens, numa proporção de 100 para 1. Nas mulheres a doença é mais frequentemente diagnosticada entre 40 e 60 anos de idade (EASTON, 2002). É estimado que uma entre cada oito mulheres, desenvolverá o câncer de mama a partir dos 85 anos. Atualmente, mais de um milhão de mulheres no mundo são diagnosticadas com o câncer de mama por ano (TOMKA *et al.*, 2001).

Nos EUA, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres e a segunda causa de morte. A identificação de casos vem aumentando nas últimas duas décadas, enquanto a mortalidade se mantém relativamente estável desde a década de 50. Um dos fatores responsáveis por esse aumento da identificação de casos são as políticas de rastreamento através da mamografia ou exame físico, além do envelhecimento progressivo da população. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) estima que, uma a cada oito mulheres, aproximadamente 12,8%, desenvolverá câncer de mama durante a vida (NCI, 2003).

O Câncer de Mama no Brasil

Observando as taxas de mortalidade no Brasil, o câncer ocupa diferentes posições, mas está sempre incluído entre as primeiras causas de morte. O câncer de mama, dentre as várias formas de cânceres, é a maior causa de morte entre as mulheres. Segundo

dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil, houve um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama em mulheres, de 6,14/100.000 para 9,31/100.000 durante o período de 1980 a 1997 (INCA, 2003).

Em 1994, os neoplasmas (tumores) foram responsáveis por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados, sendo que 53,81% dos óbitos por neoplasia ocorreram entre os homens e 46,19%, entre as mulheres. Em 1999 foram registradas 8.104 mortes decorrentes deste tipo de câncer. Foram previstos de serem diagnosticados em 2005, 49.470 novos casos. Esta tendência é consistente com a de países desenvolvidos, cuja urbanização levou ao aumento da prevalência de fatores de risco para o câncer de mama como, por exemplo, a idade tardia da primeira gravidez (INCA, 2005; SILVA *et al.*, 2002). Atualmente o câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil. Somente na Região Nordeste, as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, sendo responsáveis por 6,34% dos óbitos atestados, ficando apenas 0,02 pontos percentuais abaixo das doenças infecciosas e parasitárias. Nas demais regiões, os neoplasmas seguem às doenças cardiovasculares como causa de morte e sua proporcionalidade aumenta à medida que se desloca para o sul: 7,83% na Região Norte, 9,89% na Região Centro-Oeste, 11,93% na Região Sudeste e 15,19% na Região Sul (INCA, 2003; SILVA *et al.*, 2002). Porém, ao analisar as estimativas do INCA para o ano de 2005 verificamos um pequeno aumento na incidência do câncer de mama na região sudeste (72,74/100.000), ultrapassando a região sul (70,76/100.000) em casos de carcinomas mamários, se tornando a região brasileira com a maior incidência esperada para o ano de 2005 (INCA, 2005).

A partir destes dados, pode-se concluir que, as campanhas de auto-exame das mamas tenham algum impacto sobre esta tendência, considerando que com isso houve um aumento significativo da procura por centros de tratamento e diagnóstico.

O câncer de mama é, provavelmente, o mais temido pelas mulheres devido à sua alta frequência, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos que afetam a percepção de sexualidade e a imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência aumenta progressivamente (CLARKE *et al.*, 2002; CRUM, 1996).

Há determinados grupos de mulheres com maiores possibilidades de desenvolverem a doença. Essas mulheres têm em comum certas características denominadas fatores de risco. Tais fatores propiciaram condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, mas não obrigatoriamente levarão ao câncer de mama, ou seja, apenas há maior probabilidade de desenvolvê-lo (cerca de 80%) quando comparadas com a população feminina em geral (INCA, 2003).

O histórico familiar constitui o fator de risco mais importante, especialmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã, se foi bilateral e se desenvolveu antes da menopausa. Acredita-se que cerca de 5 a 10% dos tumores de mama sejam hereditários (ABELIOVICH *et al.*, 1997; NELEN *et al.*, 1996). É estimado que 15 a 20% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama possuem um histórico familiar da doença (EASTON, 2002; TOMKA *et al.*, 2001). PETO e MACK (2000) descreveram a manifestação do câncer de mama em um estudo feito com gêmeas monozigótica e em outros parentes de mulheres afetadas, que corroborou a hipótese de um padrão de herança. As principais síndromes hereditárias que compõem o espectro de susceptibilidade genética para o câncer de mama incluem: Síndrome Câncer de Mama, Síndrome Câncer de ovário e mama, Síndrome Câncer de cólon e mama, Síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Cowden, Ataxia-Talangectasia (AT) (WU *et al.*, 2000; BELL *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 1998).

Outro fator de risco é a exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos, relacionado com uma alteração do tipo sentido trocado no gene *ATM* (BANIN *et al.*, 1998; CANMAN *et al.*, 1998). A menopausa tardia (além dos 50 anos, em média) está associada a uma maior incidência, assim como a primeira gravidez após os 30 anos de idade (EASTON, 2002; TOMKA *et al.*, 2001; KIRSCH, 1997).

Continua sendo alvo de muita controvérsia o uso de contraceptivos orais no que diz respeito à sua associação com o câncer de mama. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, com destaque para as que usaram fármacos com dosagens elevadas de estrogênios ou por longo período de tempo, têm maior risco. No entanto, ainda não está comprovado se a mulher que retarda intencionalmente a gravidez através do uso de contraceptivos orais, para depois dos 30 anos tem maior risco de desenvolver câncer de

mama, do que aquelas que fazem tratamento para infertilidade a base de hormônios (ANDERSON, 2002). Outro fator de risco é a ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidade moderada, que gera um aumento do risco de câncer de mama (EASTON, 2002; ANDERSON, 2002; CECIL, 1997).

No quadro 1 estão apresentados alguns critérios de inclusão utilizados em centros de estudo de cânceres de mama e ovário no mundo. A partir destes critérios foram formulados critérios de inclusão que se encaixem a realidade brasileira, mais especificamente na região de Campinas.

Quadro 1- Critérios utilizados nos estudos genéticos e moleculares correlacionados ao câncer de mama com importante etiologia genética.

	EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY BCLC	NATIONAL CANCER INSTITUTE	NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK	SOCIEDADE PORTUGUESA DE SENOLOGIA
História pessoal	Câncer de mama diagnosticado com menos de 45 anos;	Câncer de mama diagnosticado com menos de 50 anos;	Câncer de mama diagnosticado com menos de 40 anos;	Câncer de mama diagnosticado com menos de 35 anos;
	Câncer de mama bilateral;	- Câncer de mama bilateral; - câncer de ovário;	Cânceres de mama e ovário diagnosticados no paciente;	Câncer de mama bilateral;
História familiar	Mais de três casos de câncer de mama e mais de um de ovário;	Múltiplos casos de câncer de mama na família;	Múltiplos tipos de câncer em uma mesma família: neoplasias de mama, tireóide, córtex da adrenal, sarcomas linfomas e leucemias;	Familiar com câncer de mama e/ou de ovário, um dos quais diagnosticados antes dos 60 anos, ou câncer de mama bilateral;
	Mais de dois familiares com câncer de mama;	Câncer de mama e de ovário na família;		Dois ou mais familiares do 1º grau com câncer de mama ou de ovário, independente da idade de apresentação da neoplasia; Dois familiares do 1º grau – um com carcinoma de mama na pré-menopausa;
	Câncer de mama masculino;	Um ou mais familiares com dois carcinomas primários;		
		Câncer de mama masculino;	Presença de um familiar com mutação dos genes de predisposição do câncer de mama;	Homem com carcinoma de mama, independente da idade; Qualquer familiar com mutação do BRCA.

Elaborado a partir de: BCLC – Breast Cancer Linkage Consortium, 2003; NCI – National Cancer Institute, 2002; NCCN – National Comprehensive Cancer Network, 2003; Sociedade Portuguesa de Senologia, 2003.

A Genética do Câncer de Mama

Vários genes estão envolvidos na susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama. Dois genes foram inicialmente relacionados com o câncer de mama familiar (*BRCA1* e *BRCA2*).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* parecem conferir uma estabilidade genômica através do seu envolvimento com os processos de recombinação, transcrição e reparo dos homólogos. Sugere-se uma ação conjunta entre as proteínas BRCA1 e BRCA2 com CHEK2, ATM, RAD53, RAD51 e p53, no que diz respeito ao reparo do DNA (MOTOYAMA & NAKA, 2004; KHANNA & JACKSON, 2001; KERR & ASHWORTH, 2001; BEGER *et al.*, 2001; WELCSH *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000; WILSON *et al.*, 1999).

FORD e colaboradores (1998) citam a contribuição de *BRCA1* e *BRCA2* para a herança do câncer de mama, através do estudo de ligação e análise de mutação em 237 famílias, estando 52% dos casos associados ao *BRCA1*, 32% ao *BRCA2* e 16% relacionados a outros genes. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, portanto, não são os únicos responsáveis pelo câncer de mama havendo assim ainda uma parcela desta doença a ser elucidada (CUI *et al.*, 2001).

Um dos genes que foram relacionados com o câncer de mama foi o gene *ATM* (DÖRK *et al.*, 2001).

Proteína ATM

A proteína ATM (de Ataxia Telangiectasia Mutado) é um membro da família fosfatidilinositol-3 quinase, que responde a danos no DNA por fosforilação de substratos chave envolvidos no reparo do DNA e/ou controle do ciclo celular. É composta por 3056 aminoácidos com peso molecular de 350,6 kD (SAVITSKY *et al.*, 1995a; SAVITSKY *et al.*, 1995b; BYRD *et al.*, 1996; KAPP *et al.*, 1992).

BROWN *et al.* (1997) demonstraram que a proteína ATM é singular, possuindo um alto peso molecular e predominantemente restrita ao núcleo dos fibroblastos humanos, apesar de se apresentar em frações nucleares e microssomais de linfoblastos e linfócitos do sangue periférico. Os níveis e localização da proteína ATM permanecem constantes durante

todos os estágios do ciclo celular. A proteína ATM truncada não foi encontrada em linfoblastos de pacientes portadores de ataxia telangiectasia homozigotos para mutações que desencadeiam uma terminação prematura da proteína. A exposição de células humanas normais à radiação gama e a drogas radio miméticas não apresentaram nenhum efeito nos níveis da proteína ATM, em contraste com os níveis aumentados da proteína p53 (TP53) durante o mesmo período. Achados referentes à expressão constitutiva fundamental e à localização nuclear da proteína ATM consistem em um modelo potencial de respostas celulares a danos no genoma (KHANNA E TRENCH, 2004).

A proteína ATM parece agir, segundo vários estudos, em duas linhas básicas quanto ao sistema de reparo do DNA. Em uma primeira linha na localização de danos no DNA e em uma segunda linha de atuação na realização de pontos de checagem (Figura 1) (KHANNA E TRENCH, 2004).

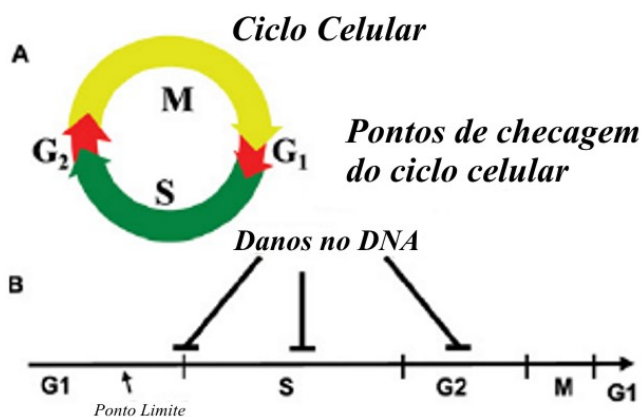


Figura 1- Pontos de checagem de danos no DNA: (A) Ciclo celular; fase S, onde o DNA é copiado; fase M onde o DNA é distribuído de forma igualitária às duas células filhas. Duas fases de intervalo, G₁ e G₂, que separam os dois eventos principais; (B) Representação esquemática dos pontos de checagem do DNA. As células interrompem o ciclo em G₁ antes de S (ponto de checagem G₁/S), interrupção temporária da síntese de DNA na fase S (ponto de checagem intrafase S) e as células interrompem o ciclo em G₂ antes da Mitose (G₂/M). A proteína ATM controla todos os pontos de checagem (KHANNA E TRENCH, 2004).

ATM no maquinário de respostas a danos no DNA

Em resposta a danos no DNA, ATM e ATR fosforilam a histona H2AX e com isso facilitam o recrutamento e fosforilação dos mediadores como o MDC1, 53BP1, BRCA1 e o complexo MRE11-RAD50-NDS1. A pausa na replicação do DNA resulta do recrutamento do complexo ATR-ATRIP por RPA. A formação do “foci” nuclear de complexos mediadores promove a transmissão do sinal resultante do dano no DNA para os alvos subsequentes como Chk1, Chk 2, FANCD2 e SMC1. O complexo PCNA-RAD1-RAD9-Hus1, RFC-RAD17 e Claspin, podem colaborar na regulação do ponto de checagem através da detecção de produtos diferenciados da replicação do DNA. As proteínas de reparo de mau emparelhamento (mismatch) MLH1 e MSH também estão envolvidas na ativação da via ATM-Chk2. As quinases Chk1 e Chk2 fosforilam efetores como p53, CDC25A e CDC25C e por meio disso retardam a progressão do ciclo celular ou induzem o envelhecimento ou apoptose através da ativação dos pontos de checagem G1/S, Intra S ou G2. Desta maneira, este mecanismo de ponto de checagem de danos no DNA coopera com o maquinário de reparo do DNA (figura 2) para eliminar instabilidades genômicas e câncer (MOTOYAMA & NAKA, 2004).

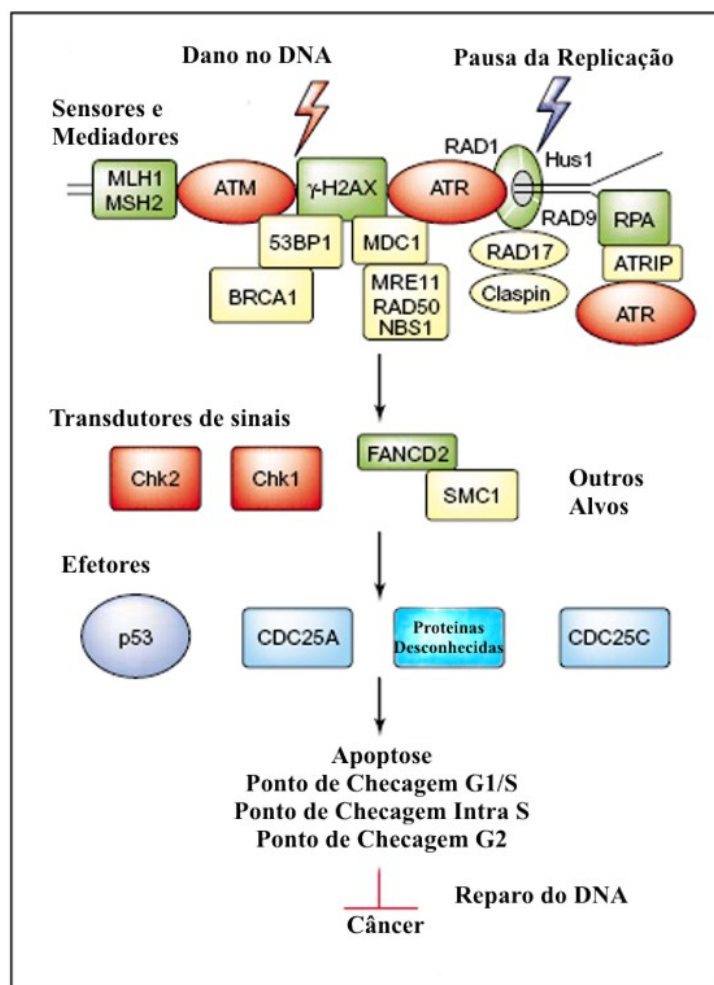


Figura 2- Maquinário de ação de resposta a danos no DNA (MOTOYAMA & NAKA, 2004).

Ponto de Checagem G1/S

A interrupção do ciclo celular em G1/S é regulada pelo amplamente conhecido supressor tumoral p53. A perda da atividade de p53, como resultado de mutações, abole o ponto de checagem G1/S (figura 3). A fosforilação ATM dependente da serina-15 regula a atividade transcricional de p53 e a fosforilação regulada por ATM de Mdm2 na serina-395 diminui a capacidade de Mdm2 transportar p53 do núcleo para o citoplasma, resultando em um acúmulo nuclear de p53 e estabilização de seus níveis em resposta a IR. A consequência desta fosforilação é a regulação da atividade de CHEK2 e consequentemente a fosforilação

de Cdc25A. Esta fosforilação estimula a degradação de Cdc25A, que bloqueia a entrada na fase S após IR através da desfosforilação/ativação dependente de Cdc25A da quinase ciclo dependente Cdk2 (KHANNA E TRENCH, 2004). A ATM controla a parada em G1 através de regulação da ativação/estabilização de p53. Em condições normais a p53 é uma proteína de vida curta. A proteína Mdm2 habitualmente interage com a p53. A ATM regula a fosforilação de p53 em diversos sítios. Direta ou indiretamente, ambos são ativados por outras quinases, como por exemplo, o Mdm2, que bloqueia a interação protéica entre eles, resultando em uma estabilização de ativação da transcrição de p53. A p53 ativa a transcrição de Cdk, um inibidor de p21, que inativa o complexo ciclina E-Cdk2 e impede a entrada na fase S através do supressor tumoral Retinoblastoma (Rb) mediante a segregação de E2F, um fator de transcrição essencial para a indução de uma variedade de genes necessários para a entrada na fase S (KHANNA E TRENCH, 2004).

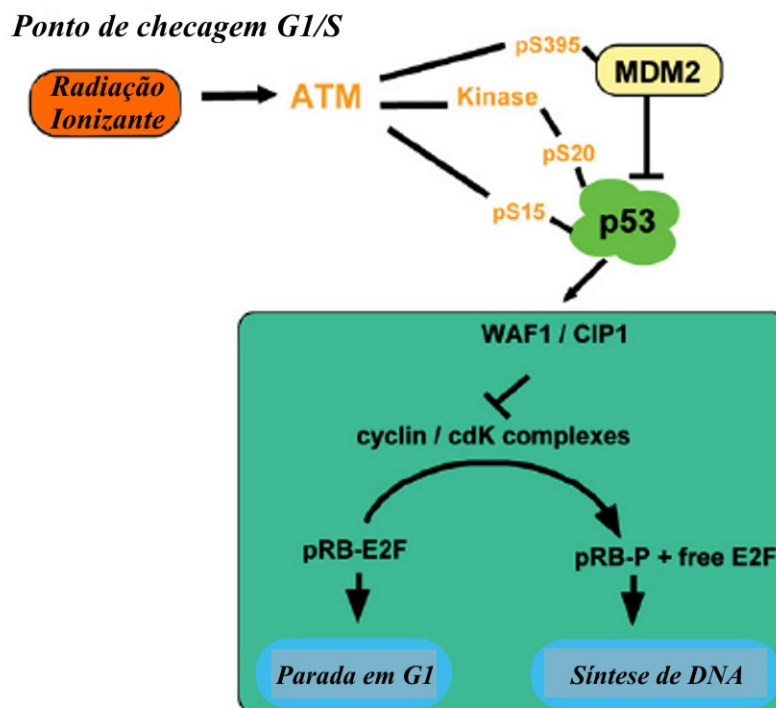


Figura 3- Ponto de checagem G1/S ATM dependente(KHANNA E TRENCH, 2004).

Ponto de Checagem da Fase S

O ponto de checagem da fase S (figura 4) provoca uma redução rápida e reversível na síntese de DNA, que se reflete como uma diminuição na taxa de replicação. Na ausência de ATM, a diminuição DSB induzida durante a síntese de DNA reduz significativamente, acarretando em uma síntese abundante de DNA rádio resistente (RDS) (KHANNA E TRENCH, 2004; BROWN *et al*, 1997; FALCK *et al*, 2001). Os principais alvos de ATM envolvidos neste ponto de checagem são as quinases Chek2 e Chek1. Ambas fosforilam Cdc25A fosfatase, sinalizando-a para degradação. A destruição de Cdc25A fosfatase resulta em uma interrupção do ciclo celular na fase S através do complexo Ciclina E-Cdk2 em sua forma fosforilada/inativa T14Y15. O complexo MRE e BRCA1 podem simular a regulação deste ponto de checagem através de uma regulação ATM dependente pela fosforilação/ativação de Chek1 e Chek2. As vias SMC1 e FANCD2 que controlam o ponto de checagem da fase S ainda não foram elucidadas. Contudo, pode-se supor um envolvimento a partir de sua ativação defeituosa no ponto de checagem da fase S seguido da fosforilação ATM dependente destas proteínas (KHANNA E TRENCH, 2004).

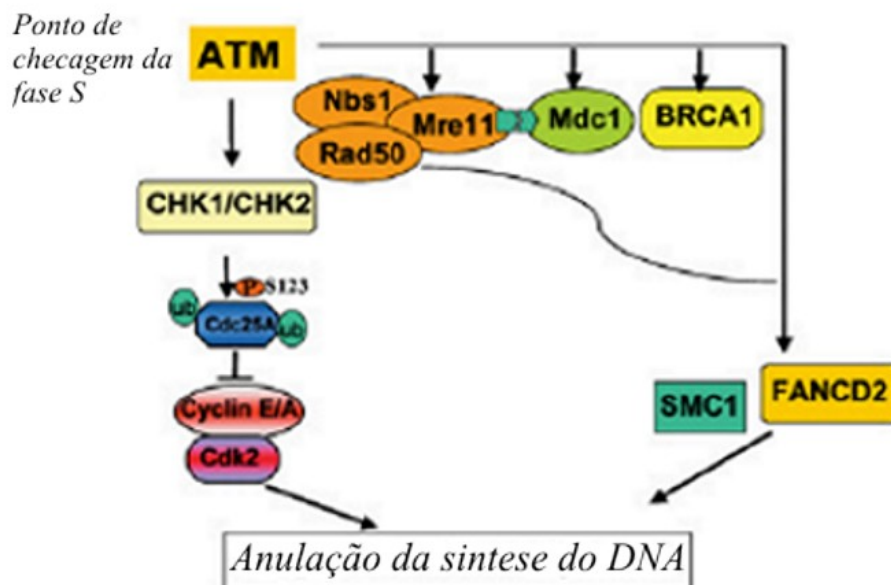


Figura 4- Ponto de checagem ATM dependente da fase S (KHANNA E TRENCH, 2004).

Ponto de Checagem G2/M

O ponto de checagem em G2 (figura 5) é o ultimo ponto de checagem do ciclo celular, que impede a entrada do DNA danificado da célula na mitose. Existem dois pontos de checagem moleculares distintos, diferindo do estágio do ciclo celular no momento da irradiação. As células irradiadas em G1 ou em S vão ter o ciclo interrompido em G2, enquanto as células irradiadas em G2 vão ter o ciclo interrompido antes da entrada da mitose. ATM é dispensável nas interrupções em G2, porém é necessário no ponto de checagem G2/M, que interrompe o ciclo de células irradiadas em G2 pouco antes da entrada da mesma em mitose. Os elementos críticos da rede enzimática do ponto de checagem G2 em *S. pombe* são ATM/ATR homólogos de Rad3 e CHK1/CHK2 homólogos de CHK1/Cds1. Uma via análoga funciona em células de seres humanos onde ATM e ATR revezam os sinais de ponto de checagem com CHK1 e CHK2. Em mamíferos, de forma similar, a compreensão da função de BRC1, 53BP1 e MDC1 demonstram um direcionamento de seus substratos para ATM/ATR que desta maneira regula a resposta de diversos pontos de checagem (KHANNA & TRENCH, 2004; YARDEN *et al*, 2002). Chek1 e Chek2 são os maiores responsáveis pelo envolvimento de ATM na obstrução da entrada de células danificadas na mitose. Depois de ativados, CHK1 e CHK2 fosforilam Cdc25C, resultando na inativação e remoção pelas proteínas 14-3-3. Portanto, Cdk1 é mantido inativo, em um estado fosforilado, impedindo a entrada da célula na mitose. Um número de proteínas adicionais incluindo o complexo Rad9, o complexo MRN, BRCA1 e 53BP1, contribuem com este ponto de checagem regulando através de fosforilação/ativação ATM dependente de CHK1 e CHK2 (KHANNA E TRENCH, 2004).

Uma forma particular de dano no DNA é a quebra bifilamentar de DNA (DNA DSBs – “DNA Double Strand Breaks”). De forma notável, células de pacientes com AT ou camundongos são intensamente sensíveis à radiação ionizante (IR) e outros agentes que induzem a DNA DSBs, e falham ao ativar os pontos de checagem induzidos por IR em G1/S ou G2/M (KHANNA *et al*, 2001).

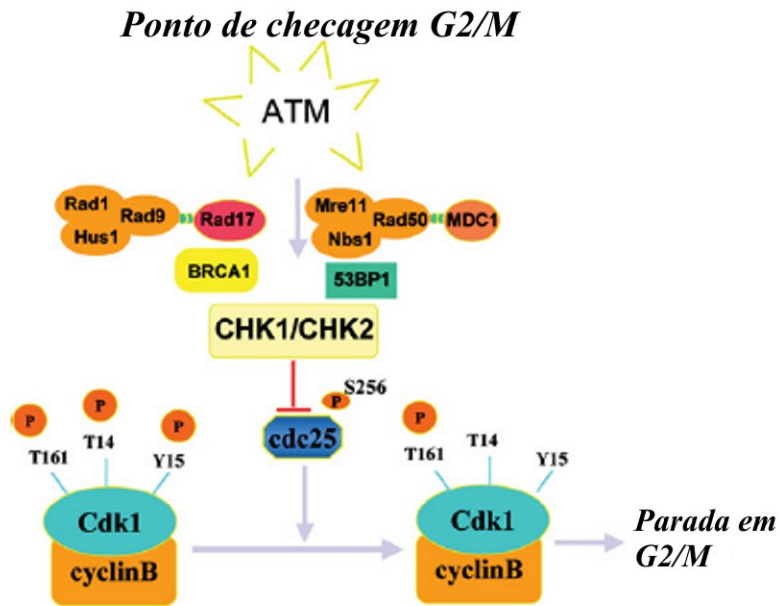


Figura 5- Ponto de checagem G2/M ATM dependente (KHANNA E TRENCH, 2004).

Mutação em *ATM*

KAPP *et al.* (1992) relataram a clonagem de um suposto gene responsável pela Ataxia Telangectasia. SAVITSKY *et al.* (1995a) identificaram e designaram o gene.

UZIEL *et al.* (1996) determinaram a organização genômica do gene *ATM*. O gene contém 66 exons distribuídos em aproximadamente 150 kb de DNA genômico. Os dois primeiros exons, 1a e 1b podem ser utilizados em transcrições alternativas. Por mapeamento através de análise de ligação da ataxia telangectasia o gene *ATM* foi descrito no cromossomo 11 na região q22.3 (Figura 6) (GATTI *et al.*, 1988, 1993). A diversidade e ampla distribuição das mutações em pacientes com AT, limita a análise direta como uma ferramenta diagnóstica ou como método de identificação de portadores, excetuando quando o efeito fundador das mutações está envolvido (CONCANNON e GATTI, 1997).

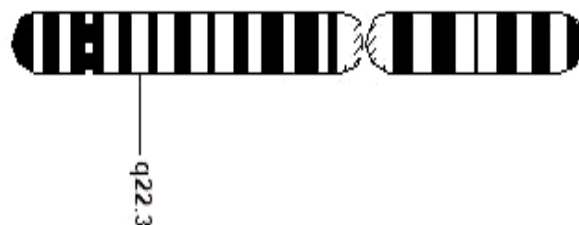


Figura 6- Histograma do cromossomo 22 com o locus do ATM.

SAVITSKY *et al.* (1995a) constataram que *ATM* se encontra mutada em pacientes com AT de todos os grupos de complementação, sendo um indicativo de que o gene *ATM* provavelmente seria o único responsável pela doença. Diversas mutações desde então foram descritas para o gene *ATM* (Quadro 2).

BYRD *et al.* (1996) identificaram seis mutações localizadas na região N terminal da proteína ATM. Todas as mutações identificadas por esse grupo eram deleções exceto uma inserção.

TERAOKA *et al.* (1999) também observaram vários casos de troca de exons tanto em controles normais quanto em pacientes para os quais não foi encontrado defeito no DNA genômico, sugerindo cuidado na interpretação na deleção de exons em cDNA quando não há identificação de mutações genômicas.

GILAD *et al.* (1996) analisaram mutações em 55 famílias com AT, utilizando RT-PCR (“Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”) de RNA extraído de cultura de fibroblastos ou linfoblastos, seguido por restrição com endonucleases dos produtos de PCR. De 44 mutações de AT identificadas, 39 (89%) levavam à inativação da proteína ATM por terminação abrupta, anulando a iniciação ou terminação correta da tradução, ou deletando grandes segmentos. Mutações adicionais foram observadas incluindo quatro pequenas deleções e inserções e uma substituição de uma região extremamente conservada no domínio quinase PI-3.

Através da análise de DNA de tumores de pacientes com Leucemia Prolinfocítica de células T (TPLL - T-cell prolymphocytic leukemia), uma variante clonal maligna com similaridades com a leucemia em células T maduras verificado em AT, VORECHOVSKY *et al.* (1997) demonstraram uma alta frequência de mutações no gene *ATM* em TPLL.

VORECHOVSKY *et al.* (1997) também estudaram mutações no gene *ATM* para Linfomas não-Hodgkin em células B (BNHL - B-cell non-Hodgkin lymphomas) e detectaram três mutações sentido trocado.

No linfoma MCL (“mantle cell lymphoma”), a translocação t(11;14) é considerada a característica citogenética principal desta doença. STILGENBAUER *et al.* (1999) identificaram uma deleção comum na região 11q22-q23, menor que 1Mb, que inclui um *locus* do gene *ATM* em casos de MCL.

SCHAFFNER *et al.* (2000) relataram a inativação de ambos os alelos do gene *ATM* devido a uma deleção e por uma mutação de ponto deletéria na maioria dos casos analisados, indicando que a proteína ATM atua em uma parte da iniciação e (ou) progressão da MCL.

Para investigar o potencial patogênico do gene *ATM* em células B cancerosas, SCHAFFNER *et al.* (1999) realizaram análise de mutação de *ATM* em 29 linfomas malignos originários de células B (27 casos de B-CLL e 2 casos de MCL). Vinte e três dos 29 pacientes eram portadores de uma deleção na região 11q22-q23. A deleção de um dos alelos de *ATM* em cinco B-CLL e um MCL, uma mutação de ponto detectada no alelo remanescente, que resultara em uma mutação de “splicing”, resultando em uma alteração de proteína ou uma proteína truncada.

O estudo demonstrou uma disrupção somática de ambos os alelos no *locus ATM* devido a uma mutação de ponto deletéria e desta maneira explicando a patogenicidade de tumores esporádicos em células B.

LI *et al.* (2000) demonstraram que a proteína BRCA1-associada à CTIP se torna hiper fosforilada e dissociada de BRCA1 sob radiação ionizante. Esta fosforilação necessita a presença da proteína ATM. A ATM fosforila CTIP na serina-664 e serina-745, uma mutação nestes sítios gerando uma alanina anula a dissociação de BRCA1 de CTIP,

resultando em uma repressão persistente de GADD45 uma proteína BRCA1-dependente sob radiação ionizante. LI *et al.* (2000) concluíram que a ATM, por fosforilação de CTIP sob radiação ionizante, pode modular a regulação de resposta a danos no DNA por GADD45 mediada por BRCA1, desta forma fornecendo uma possível ligação entre ATM mutado e o câncer de mama.

Quadro 2: Mutações no gene ATM.

TIPO DE MUTAÇÃO	MUTAÇÃO	CITAÇÃO
Mudança da Matriz de Leitura	3801delG	LI & SWIFT, 2000
Splicing	1066-6T>G	BROEKS <i>et al.</i> , 2000
Sentido Trocado (Neutras)	735C/T	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	1020C/A	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	2193C/T	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	4578C/T	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
Sentido Trocado	S49C	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	I550V	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	P604S	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	S707P	LI & SWIFT, 2000
	F858L	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	P1054R	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	L1420F	LI & SWIFT, 2000
	V1570A	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	S1691R	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	D1853N	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	D1853V	DÖRK <i>et al.</i> , 2000
	A2274T	SCOTT, <i>et al.</i> , 2002
	G2287A	SCOTT, <i>et al.</i> , 2002
	C2464R	SCOTT, <i>et al.</i> , 2002
	S2592C	SCOTT, <i>et al.</i> , 2002
	G2772R	SCOTT, <i>et al.</i> , 2002

Mutações em *ATM* x Câncer de Mama

Diversas mutações foram associadas com o fenótipo de câncer de mama por vários autores como observado no quadro 2.

Estudo realizado em 350 indivíduos da população holandesa constatou que heterozigotos para IVS10-6T>G apresentam um aumento de aproximadamente nove vezes de possibilidade de desenvolver um tipo de câncer de mama, sendo mais freqüente o bilateral em idade precoce. Foi observada também uma similaridade de freqüências de mutações no gene *ATM* em indivíduos com história familiar de câncer com indivíduos portadores da forma esporádica (BROEKS *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado com 270 famílias com HBOC (câncer de mama e ovário hereditários) na população austríaca identificou 137 alterações diferentes, corroborando a possível ligação existente entre mutações no gene *ATM*, como as mutações S707P, L1420F e IVS10-6T>G, com câncer de mama (THORSTENSON *et al.*, 2003).

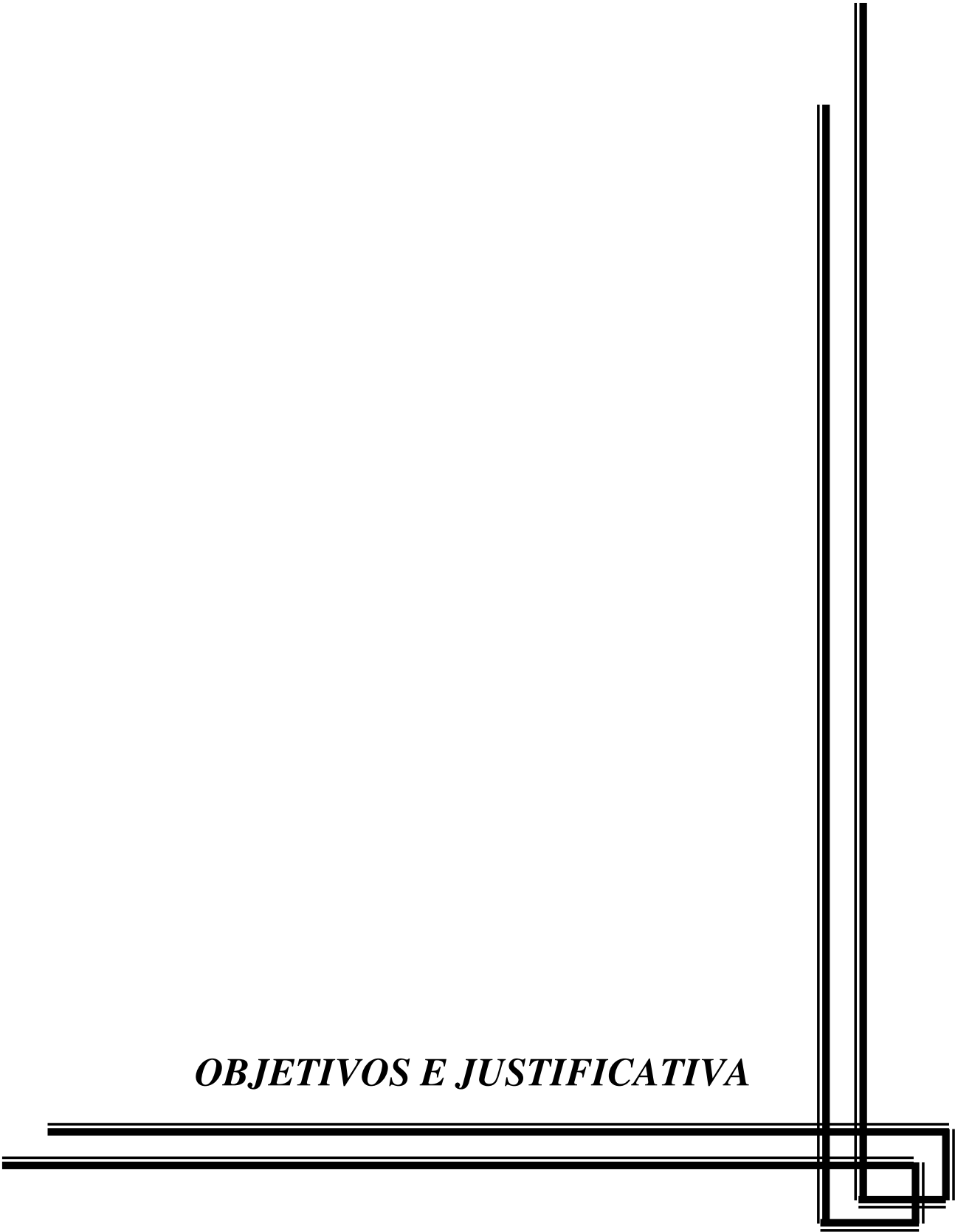
Em estudo realizado por DÖRK *et al.* (2001) em mulheres alemãs a mutação S707P foi observada com uma freqüência aumentada em duas vezes em pacientes com câncer de mama e em cinco vezes em pacientes com a forma bilateral. Foi também citando uma prevalência alta para a mutação IVS10-6T>G (0,7%).

Contudo, estudo realizado no Reino Unido com pacientes portadores de AT e seus familiares revelou uma freqüência aumentada de câncer de mama. sendo observada uma freqüência dentre os pais dos pacientes de 5/245 (esperado de 2,67 com 95% IC) e entre os demais familiares 23/1160 (esperado de 14,6 e 95% IC) apresentando um risco relativo de 2,25 (THOMPSON *et al.*, 2005a).

Em estudos realizados com camundongos *knockout*, BALB/cHeA-*p53*^{+/-} e MSM/Ms-*ATM*^{+/-}, os resultados indicaram um aumento significativo na carcinogênese mamaria em heterozigotos para o gene *ATM* em camundongos *p53*^{+/-} (heterozigotos) (UMESAKO *et al.*, 2005).

Os resultados de DÖRK *et al* (2001) deixam em aberto a possibilidade de variantes alélicas de *ATM*, embora não sendo as variantes clássicas encontradas na ataxia telangiectasia, poderem regular o processo e o prognóstico do carcinoma de mama. Em uma comparação com as características clínicas de pacientes portadores da substituição S707P com não portadores, os autores falharam na observação de diferenças relacionadas à idade de início do carcinoma, porém foi encontrada uma proporção acentuadamente alta em pacientes com diagnóstico de nódulo axilar positivo (17 de 26; $p < 0,01$) e uma proporção igualmente alta em câncer de mama bilateral (5 de 26; $p = 0,02$) entre heterozigotos para S707P. De modo geral a substituição S707P mostrou-se cinco vezes mais freqüente em pacientes com câncer bilateral ($p < 0,001$) que nas amostras retiradas ao acaso da população.

Estudos epidemiológicos confirmam o risco aumentado para câncer de mama e outros cânceres em heterozigotos para *ATM*. No entanto alguns estudos de mutações no gene *ATM* tem falhado em grande medida para revelar o aumento da incidência em pacientes com câncer de mama. Ainda que algumas evidências apóiem a implicação de mutações sentido trocado em *ATM* no câncer de mama, a presença de uma grande diversidade de variantes sentido trocado raras somado a polimorfismos comuns no gene *ATM* tem gerado grandes dificuldades em estabelecer relações em estudos de associação. Para investigar a consequência funcional destas alterações, SCOTT *et al.* (2002) introduziram mutações sentido trocado que têm sido identificadas tanto em pacientes com AT quanto em pacientes com câncer de mama, no cDNA de linhagens celulares estáveis para determinar seus efeitos na função de ATM. Mutações de sentido sentido trocado patogênicas e variantes neutras foram descritas inicialmente pela sua capacidade de corrigir o fenótipo rádio sensível das células AT. Posteriormente, mutações de sentido trocado aboliram a atividade de quinase radio induzida de ATM em células controle normal, gerando instabilidade cromossômica e redução da variabilidade celular em células controle irradiadas. A proteína ATM mutante foi expressa no mesmo nível que as proteínas endógenas, a interferência com a proteína normal mostrou-se ocorrer por multimerização. A abordagem de SCOTT *et al.* (2002) representa uma forma de identificar uma genuína mutação de ATM e correlacionar a importância das mutações sentido trocado em uma variedade de cânceres, incluindo o câncer de mama.



OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Objetivos

Avaliar a presença da mutação *S707P* no gene *ATM* em pacientes portadoras de câncer de mama.

Investigar a possível associação entre a mutação *S707P* do gene *ATM* e o câncer de mama.

Relacionar os achados moleculares com a apresentação clínica da doença e o grau histológico dos tumores

Justificativa

Este trabalho supre a necessidade de pesquisa dos genes envolvidos na cadeia bioquímica de resposta a danos e reparo do DNA, relacionando-os com o câncer de mama.

Segundo observado na literatura, dados relevantes quanto a mutações no gene *ATM* mostram-se pertinentes quando relacionados com indivíduos com diagnóstico para câncer de mama, dada a sua importância clínica no que diz respeito ao tratamento destes indivíduos com radiação ionizante e/ou fármacos rádio miméticos.

Este é o primeiro estudo no Brasil que procura a associação da mutação *S707P* no gene *ATM* com o câncer de mama.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1- Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP (CEP 535/2002) (Anexo 1). Os indivíduos selecionados participaram do projeto somente depois de obtida a concordância e a assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular fosse confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e DNA foram identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entrou no estudo. Informações geradas durante o estudo e que puderam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos, foram comunicadas aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes. Dados para serem usados em diagnóstico preditivo não foram gerados por este projeto.

O objetivo e os procedimentos envolvidos no projeto foram explicados aos pacientes e aos seus familiares, quando presentes.

Este é um estudo observacional, prospectivo, analítico do tipo caso/controle que analisou 221 indivíduos divididos em três grupos distintos, (I) pacientes portadores de câncer de mama com histórico familiar, (II) pacientes portadores de câncer de mama sem histórico familiar, (III) indivíduos sem diagnóstico de câncer de mama e sem histórico familiar de tal condição.

Nos estudos de associação, a maior possibilidade de se ter resultados falso-positivos se dá na escolha errada do grupo controle (LANDER & SCHORK, 1994; ANDERSON *et al*, 2002). Se o grupo controle e os pacientes não forem da mesma etnia, existe a possibilidade de se detectar diferenças significativas nas frequências alélicas relacionadas às diferenças étnicas. Por esse motivo, para a população controle tivemos o cuidado de recrutar indivíduos não aparentados com os pacientes e de mesma origem geográfica, sem histórico pessoal ou familiar de câncer de mama o que, mesmo assim, não garante uma homogeneidade étnica, visto a miscigenação da nossa população.

Um questionário semi-estruturado foi utilizado para obter informações detalhadas sobre a história clínica e exames de biópsia mamária do paciente e de todos os participantes (Anexo 3). Esse protocolo de avaliação clínica tinha como objetivo a

uniformidade na obtenção dos dados clínicos e uma avaliação detalhada do fenótipo dos participantes, assegurando um diagnóstico mais acurado possível do câncer de mama hereditário.

1.1- Critérios de Inclusão para indivíduos dos grupos I e II

Para serem incluídos nos grupos I e II, os pacientes deveriam respeitar os seguintes critérios:

- 1- Portador de Câncer de mama e bilateralidade, ou;
- 2- Familiar com câncer de mama e/ou de ovário, um dos quais diagnosticado em idade inferior a 60 anos, ou câncer bilateral de mama, ou;
- 3- Dois ou mais familiares em 1º grau com câncer de mama ou ovário, independentemente da idade de apresentação da neoplasia, ou;
- 4- Dois familiares em 1º grau com câncer de mama, um deles diagnosticado em idade inferior a 45 anos, ou;
- 5- Dois familiares em 1º grau com câncer de ovário, ou;
- 6- Familiar do sexo masculino com câncer de mama, independentemente da idade;

O critério para inclusão no grupo I ou II é a presença de histórico familiar.

1.2- Critérios de Inclusão para indivíduos do grupo controle

- 1- Não possuir diagnóstico de câncer de mama;
- 2- Não possuir histórico familiar de câncer de mama, ovário ou próstata;
- 3- Enquadrar-se na mesma faixa etária do grupo caso.

2- Métodos

Foram colhidos aproximadamente 30 mL de sangue periférico em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA de todos os participantes da pesquisa. Esse material foi mantido à temperatura ambiente (~25°C) para posterior processamento.

2.1- Extração de DNA com Fenol

A extração do DNA genômico das amostras colhidas foi realizada utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol-clorofórmio. Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos dos indivíduos recrutados para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde estão localizados os leucócitos, foi transferida para um tubo de propileno em fundo cônico. Em seguida, foram adicionados as soluções de RSB 1X (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada a 2900 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação foram acrescentados 3 ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5 ml de fenol e 1,5 ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3 ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6,0 ml de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20 ml de sangue venoso).

2.2- Análise de mutação

2.2.1- Reação em Cadeia da Polimerase

A análise da mutação S707P foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com iniciadores (“primers”) (Imprint do Brasil Ltda.) 5' taaggcaaagcattaggtacttg 3' e 5' ttctccttctaacagtttacc 3' (DÖRK *et al*, 2001) que foram sintetizados flanqueando o *locus* alvo com tamanho de 351 pb.

A reação foi realizada em volume de 50 µL, contendo 0,04 pM de cada iniciador, 0,125 mM de cada dNTP, cloreto de magnésio 1,0 mM, tampão da enzima e 1,5 U de Taq DNA polimerase(produzida em laboratório). A amplificação foi efetuada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

2.2.2- Restrição com Endonuclease

Após a digestão com enzima de restrição *Eco8II* (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) (CC↓TNAGG) (DÖRK *et al.*, 2001) segundo o protocolo de digestão de 16 horas a temperatura de 35°C, o alelo com a mutação é clivado em fragmentos de

74 / 277 pb, enquanto os alelos normais (ou sem mutação) permanecem com 351pb. Como controle da eficiência da enzima, os dados serão comparados com a sequência amplificada do gene *NAT 1*, que possui um sítio de restrição para a enzima *Eco8II*, refutando assim a atividade das restrições enzimáticas dos indivíduos estudados.

A análise dos fragmentos de restrição foi efetuada por eletroforese em gel de agarose 1,5% seguida de coloração com Brometo de etídio.

RESULTADOS

Foram analisados 49 pacientes portadoras de câncer de mama com histórico familiar com idade variando de 28 a 74 anos (média de 51 anos e D.P. de 12,638), sendo todas caucasóides com diagnóstico clínico e anatomopatológico. Analisamos também 50 portadoras de câncer de mama sem histórico familiar, com idade variando de 24 a 76 anos (média de 50 anos e D.P. de 11,399), sendo todas caucasóides. Uma amostra de 122 indivíduos adultos sendo todos caucasóides, colhidos aleatoriamente, foi utilizada como grupo controle, com idade variável de 21 a 76 (média de 48,5 anos e D.P. de 12,916). A figura 7 mostra a proporção dos grupos analisados em relação ao total da amostra.

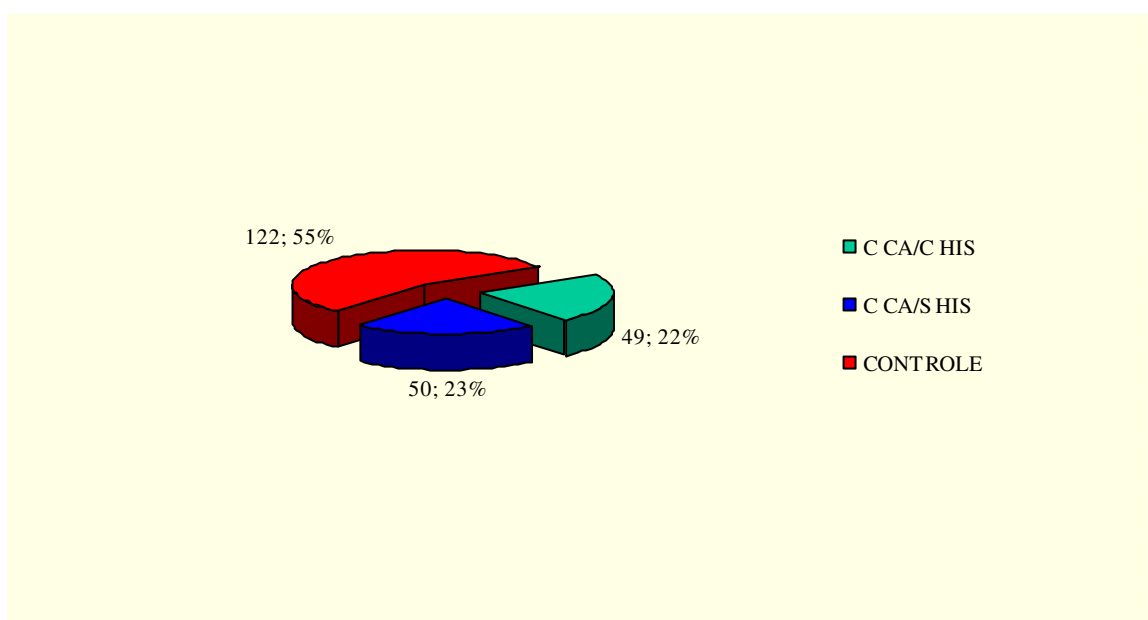


Figura 7- Distinção dos 221 indivíduos analisados com relação à presença ou não de Câncer de Mama e história familiar pregressa.

Com relação à idade de manifestação os indivíduos foram divididos em $\geq$ ou $<$ que 35 anos e verificamos nos três grupos um predomínio de indivíduos com idade superior a 35 anos (Figura 7).

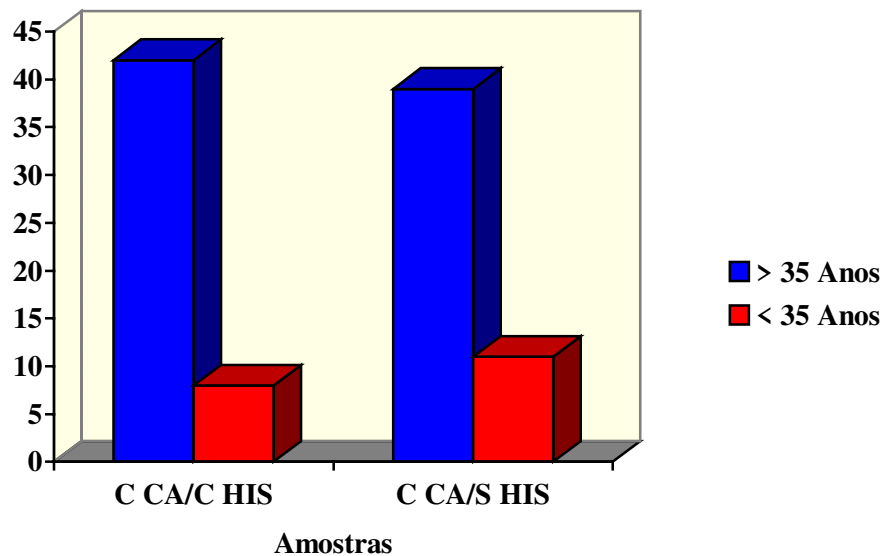


Figura 8- Distribuição dos 221 indivíduos nos três grupos em $\geq$ e $<$ de 35 anos de idade ao diagnóstico.

Avaliação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Foram analisados 49 indivíduos para as mutações de *BRCA1* e *BRCA2* que pertenciam ao grupo com diagnóstico para carcinoma de mama e com história de cânceres de mama e/ou ovário na família (C CA/C HIS). Estes indivíduos foram analisados paralelamente ao estudo de *ATM*, na tese de doutorado intitulada “Polimorfismos Genéticos em Mulheres com Carcinoma de Mama” (CEP 535/2002) de Rozany Mucha Dufloth, por SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) seguido de sequenciamento das regiões que apresentaram padrão de eletroforese anormal. Apenas 3 mulheres apresentaram mutações para *BRCA1* (0,04) e *BRCA2* (0,02), como mostra a tabela 1.

Avaliação do gene *ATM*

Dos 221 participantes da pesquisa, divididos nos três grupos descritos acima, somente dois indivíduos apresentaram a mutação S707P, ambos em heterozigose (figura 10), correspondendo a frequência alélica de 0,008 no grupo controle. A comparação do grau histológico e apresentação clínica das pacientes com câncer de mama e a presença da mutação S707P não foi possível já que nenhuma das 99 mulheres analisadas apresentou alteração em estudo. A figura 9 demonstra a PCR, dos indivíduos da amostra para os primers confeccionados para aplicarem a região do gene *ATM* onde se encontra a mutação S707P e o controle de restrição enzimática uma região amplificada do gene *NAT1*.

Tabela 1- Presença de mutação no gene *BRCA1* e *BRCA2* e da mutação S707P no gene *ATM* entre os 221 indivíduos analisados.

	<i>ATM</i> (S707P)	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
C CA/C HIS	0	2	1
C CA/S HIS	0	Ø	Ø
Controles	2	Ø	Ø

Ø, não foi pesquisado.

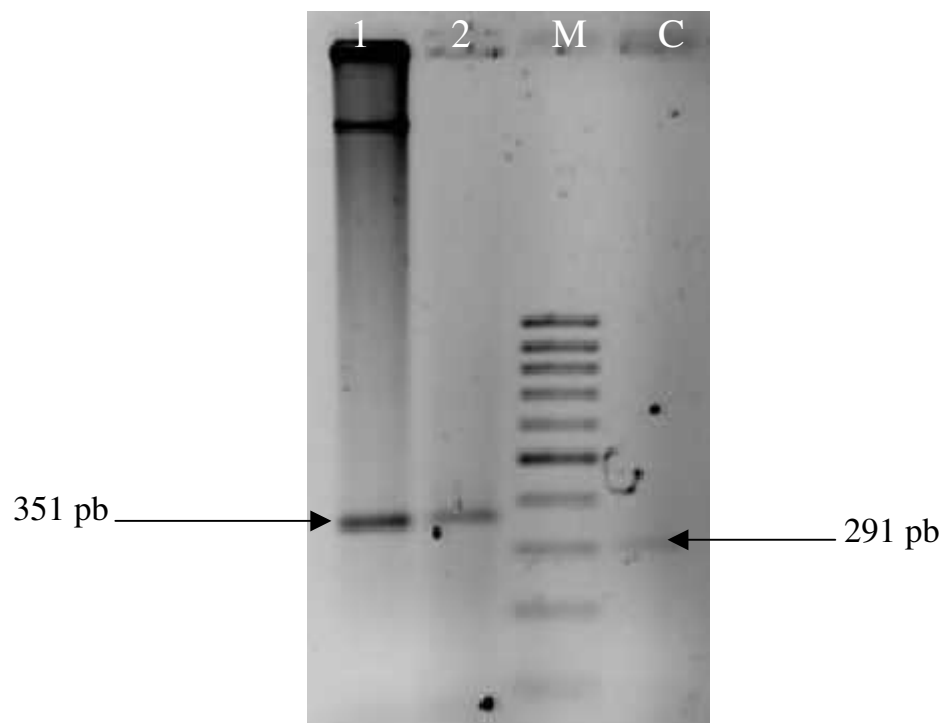


Figura 9- Reação em Cadeia da Polimerase amplificando a região de estudo da mutação S707P do gene *ATM* com padrão eletroforético observado em gel de Agarose (1,5%). Nas colunas 1 e 2 – fragmentos amplificados do gene *ATM*, M – marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas Life Sciences), na coluna C –, amplificado do controle de digestão, fragmento do gene *NAT1*.

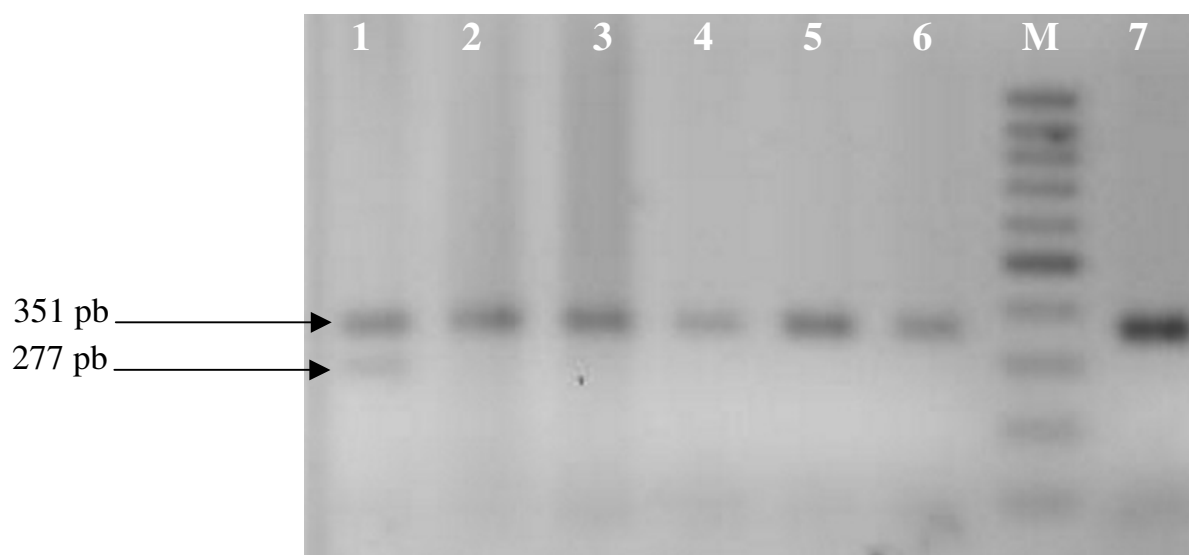


Figura 10- Análise da mutação S707P do gene *ATM* em gel de Agarose (1,5%) utilizando a enzima *Eco* 81I. Na coluna 1 – indivíduo heterozigoto para a mutação, nas colunas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 – indivíduos normais para a mutação, na coluna M – marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas Life Sciences).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a presença da mutação S707P do gene *ATM* em mulheres com diagnóstico para câncer de mama para verificarmos se essa mutação poderia ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama.

O possível papel do gene *ATM* na predisposição ao câncer de mama na população, em especial em câncer de mama feminino, faz deste gene um alvo potencial para análise. A elucidação de mutações no gene *ATM* torna viável a detecção de indivíduos mutados dentre a população geral ou em grupos específicos como as portadoras de câncer de mama ou indivíduos com histórico familiar positivo. A detecção de portadores de mutações do gene *ATM*, poderiam tornar as avaliações preventivas como as mamografias periódicas mais seguras, quando excluídos os mutantes *ATM* que são potencialmente radio sensíveis.

DUMITRESCU & COTARLA (2005) citam como genes relacionados ao câncer de mama *BRCA 1* e *2*, *p53*, *ATM*, *PTEM*, *NBS1* e *LKBI*, sendo responsáveis por uma grande parte dos carcinomas de mama hereditários. Outros estudos como THOMPSON (2005b), INGVARSSON (2004) sugerem uma possível ligação entre o câncer de mama e mutações no gene *ATM*.

Sabe-se que mutações no gene *ATM* aumentam o risco e a incidência de cânceres de mama, porém ainda não é confirmada qual a mutação com maior responsabilidade por este aumento.

Recentemente, foi sugerido que um risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama seria atribuído a mutações do tipo sentido trocado no gene *ATM* (KHANNA & TRENCH, 2004).

Porém as controvérsias a respeito da associação de mutações no gene *ATM* e o câncer de mama se mantêm quando autores como THOMPSON e EASTON (2004) relatam que todos os alelos identificados até o momento são raros, com frequências mais baixas que 1%, sugerindo que o desenvolvimento de carcinomas mamários não teria nenhuma relação com mutações no gene *ATM*. Mostram que o risco de desenvolver câncer de mama após a idade de 70 anos é de 23%, para portadores de mutações em *ATM*.

Em estudos recentes realizados no Reino Unido por THOMPSON *et al.* (2005a), estes confirmam a hipótese do gene ATM exercer um papel fundamental como gene candidato para câncer de mama.

Diversos estudos citam análises de mutações no gene *ATM* relacionando-as com câncer de mama como é o caso de THORSTENSON *et al.* (2003) que ao analisarem o gene *ATM* em famílias austríacas com diagnóstico de cânceres de mama e ovário, indicam em seus resultados uma prevalência de mutações no gene *ATM*, acentuando a susceptibilidade ao câncer de mama.

Estudos como de BROEKS *et al.* (2000) na Holanda, citam como responsáveis pelo aumento na incidência de câncer de mama a mutação IVS10-6T>G. Da mesma forma os estudos de DÖRK *et al.* (2001) na Alemanha, além de demonstrarem que uma em cada cinquenta pacientes com câncer de mama possui uma alteração no gene *ATM* também indicam a mutação IVS10-6T>G como sendo responsável pelo aumento na incidência de cânceres de mama (0,7%) e citam a mutação S707P (0,3%) como responsável pelo aumento na incidência de carcinomas de mama.

Contudo um estudo realizado na população austríaca por SZABO *et al.* (2004) concluíram que a mutação IVS10 6T>G não confere risco elevado significativo para o desenvolvimento de câncer de mama, porém não descartaram a sua importância.

DÖRK *et al.* (2001) descreveram em estudos realizados na população alemã, uma frequência alélica de 0,01 para heterozigotos da mutação S707P portadores de câncer de mama e de 0,006 para indivíduos controle ($p = 0,05$). Estudaram também outras mutações do gene *ATM*, encontrando 22% de alelos mutantes entre os 2000 analisados. Já BROEKS *et al.* (2000), analisando 82 pacientes alemães com câncer de mama, encontraram sete portadores de mutações no gene *ATM* (4,2% de alelos mutantes).

Em nosso estudo não encontramos mutantes *ATM* entre portadores de câncer de mama, mas observamos uma frequência alélica de 0,008 nos indivíduos do grupo controle. Quando comparamos essa frequência com a encontrada por DÖRK *et al.* (2001) em sua amostra controle, verificamos não haver diferença significativa (Tabela 2). Nenhum

indivíduo da população geral, refletida aqui no grupo controle, apresenta qualquer alteração na mama, no entanto, não podemos excluir a hipótese de que a presença da alteração no gene *ATM* possa acarretar em um futuro desenvolvimento de tumores.

Se o gene *ATM* fosse um gene de menor efeito, ou seja, se houvesse um aumento significativo do risco quando combinado a outros fatores (genéticos ou ambientais), ele provavelmente apareceria com maior incidência nos casos com câncer sem história familiar, o que não foi encontrado em nosso estudo. Devemos ressaltar que esse é um estudo inicial e que tal efeito pode não ter sido averiguado devido ao tamanho amostral e que um aumento da casuística poderia mostrar resultados diferentes.

Se a alteração S707P fosse identificada nos indivíduos portadores de câncer de mama como descrito na literatura, a confirmação dessa associação seria mais simples, porém, mesmo obtendo dados inconclusivos no que diz respeito à associação da mutação S707P e o câncer de mama, ainda é discutível a importância de mutações no gene *ATM* e a incidência de câncer de mama na população. O gene *ATM* demonstra ser uma ferramenta importante no reparo de danos no DNA. Seria necessário um estudo mais completo das mutações no gene *ATM* para que seja totalmente elucidada a sua associação com o câncer de mama, sendo necessária a classificação da amostra em hereditário, familiar e esporádico.

Tabela 2- Frequência alélica comparativa com o grupo controle do estudo de DÖRK *et al.*, 2001 (Alemanha).

Mutação S 707P em ATM			
	Presença	Ausência	Total
DÖRK <i>et al.</i> , 2001 (Alemanha)	6	994	1000
Presente estudo	2	242	244

$\chi^2_{(2)}=0,15$; P=0,70

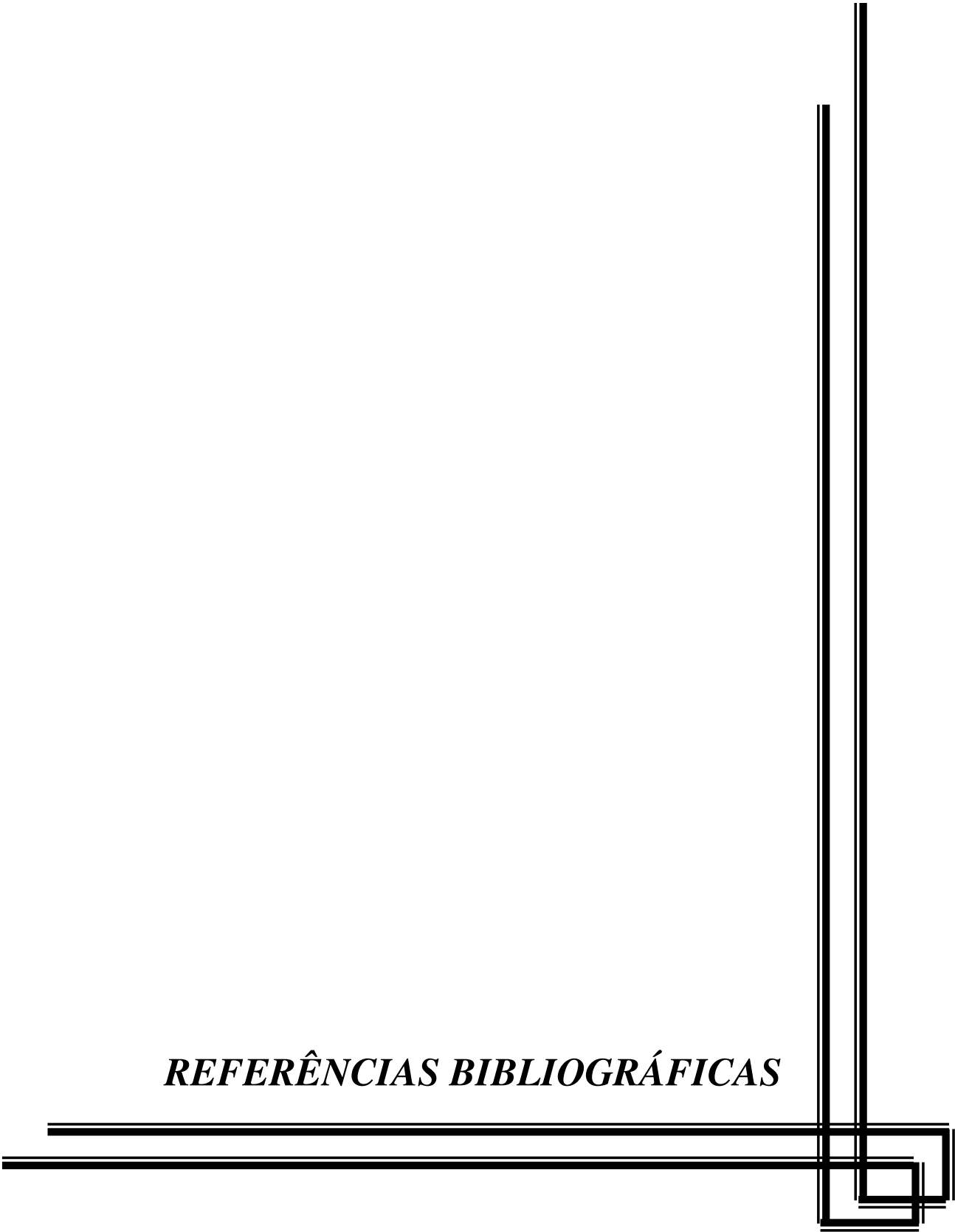
CONCLUSÃO

Não foi encontrada a mutação S707P entre os portadores de câncer de mama.

Nenhuma associação foi encontrada entre a mutação S707P do gene *ATM* e o câncer de mama em mulheres com e sem histórico familiar desta condição.

Com base nos resultados obtidos a partir deste estudo, verificamos que parece não haver um papel importante na etiologia do câncer de mama da mutação S707P do gene *ATM* na população estudada.

No entanto, não podemos afastar um efeito menor, devido ao tamanho de nossa amostra, sendo necessário a análise de uma casuística mais extensa para verificar esse efeito e adicionar outras variantes do gene *ATM*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, D.; KADURI, L.; LERER, I.; WEINBERG, N.; AMIR, G.; SAGI, M.; ZLOTOGORA, J.; HECHING, N.; PERETZ, T. The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. **Am J Hum Genet**, 60(3):505-14, 1997.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Câncer In **Biologia Molecular da Célula**. 3ª, Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 1255-91.

ANDERSON E. Progesterone receptors—animal models and cell signaling in breast cancer The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. **Breast Cancer Res**, 4: 197-201, 2002.

ANDERSON, E.; BERKOVIC, S.; DULAC, O.; GARDINER, M.; JAIN, S.; LAUE-FRIIS, M. et al. ILAE genetics commission conference report: molecular analysis of complex genetic epilepsies. **Epilepsia**, 43(10): 1262-7, 2002.

BANIN, S.; MOYAL, L.; SHIEH, S.-Y.; TAYA, Y.; ANDERSON, C. W.; CHESSA, L.; SMORODINSKY, N. I.; PRIVES, C.; REISS, Y.; SHILOH, Y.; ZIV, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by *ATM* in response to DNA damage. **Science**, 281: 1674-1677, 1998.

BCLC – Breast Cancer Linkage Consortium. Apresenta dados e informações sobre câncer de mama e ovário na Europa Disponível em: <<http://www.medfac.leidenuniv.nl/lab-devilee/bclchome.htm>>. Acesso em 1 abr. 2003.

BEGER, C.; PIERCE, L.N.; GER, M.K.; MARCUSSON, E.G.; ROBBINS, J.M.; WELCSH, P.; WELCH, P.J.; WELTE, K.; KING, M.C.; BARBER, J.R.; WONG-STAAAL, F. Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach **PNAS**, 98(1): 130–35, 2001.

BELL, D.W.; VARLEY, J.M.; SZYDLO, T.E.; KANG, D.H.; R. WAHRER, D.C.; SHANNON, K.E.; LUBRATOVICH, M.; VERSELIS, S.J.; ISSELBACHER, K.J.; FRAUMENI, J.F.; BIRCH, J.M.; LI, F.P.; GARBER, J.E.; HABER D.A. Heterozygous Germ Line hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome **Science**, 286: 2528-31, 1999.

BROEKS, A.; URBANUS, J. H. M.; FLOORE, A. N.; DAHLER, E. C.; KLIJN, J. G. M.; van't VEER, L. J. *ATM*-Heterozigous germiline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 494-500, 2000.

BROWN, K. D.; ZIV, Y.; SADANANDAN, S. N.; CHESSA, L.; COLLINS, F. S.; SHILOH, Y.; TAGLE, D. A. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 94: 1840-1845, 1997

BYRD, P. J.; MCCONVILLE, C. M.; COOPER, P.; PARKHILL, J.; STANKOVIC, T.; MCGUIRE, G. M.; THICK, J. A.; TAYLOR, A. M. R. Mutations revealed by sequencing the 5-prime half of the gene for ataxia telangiectasia. **Hum. Molec. Genet.** 5: 145-149, 1996.

CANMAN, C. E.; LIM, D.-S.; CIMPRICH, K. A.; TAYA, Y.; TAMAI, K.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; KASTAN, M. B.; SILICIANO, J. D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science** 281: 1677-1679, 1998.

CECIL, R. L. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

CLARKE, C.A.; GLASER, S.L.; WEST, D.W.; EREMAN, R.R.; ERDMANN, C.A.; BARLOW, J.M.; WRENSCH, M.R. Breast cancer incidence and mortality trends in an affluent population: Marin County, California, USA, 1990–1999 **Breast Cancer Res**, 4: 1-7, R13, 2002.

CONCANNON, P.; GATTI, R. A. Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. **Hum. Mutat.** 10: 100-107, 1997.

CRUM, C.P. Trato genital e mama femininos. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. 5^a e, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 936-1002.

CUI, J.; ANTONIOU, A.C.; DITE, G.S.; SOUTHEY, M.C.; VENTER, D.J.; EASTON, D.F.; GILES, G.G.; MCCREDIE, M.R.E.; HOPPER J.L. After BRCA1 and BRCA2—What Next? Multifactorial Segregation Analyses of Three-Generation, Population-Based Australian Families Affected by Female Breast Cancer **Am J Hum Genet**, 68: 420–31, 2001.

DÖRK T, BENDIX R, BREMER M, RADES D, KLOPPER K, NICKE M, SKAWRAN B, HECTOR A, YAMINI P, STEINMANN D, WEISE S, STUHRMANN M, KARSTENS JH. Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. **Cancer Res.** 15; 61(20):7608-15. 2001.

DUMITRESCU, R.G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med.** 9(1):208-21, 2005.

EASTON, D.F. Familiar risks of breast cancer. **Breast Cancer Res**, 4:179-81, 2002.

FALCK, J.; MAILAND, N.; SYLJUASEN, R. G.; BARTEK, J.; LUKAS, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. **Nature.** 410: 842-847, 2001.

FORD, D.; EASTON, D.F.; STRATTON, M.; NAROD, S.; GOLDFAR, D.; DEVILEE, P.; BISHOP, D.T.; WEBER, B.; LENOIR, G.; CHANG-CLAUDE, J.; SOBOL, H.; TEARE, M.D.; STRUEWING, J.; ARASON, A.; SCHERNECK, S.; PETO, J.; REBBECK, T.R.; TONIN, P.; NEUHAUSEN, S.; BARKARDOTTIR, R.; EYFJORD, J.; LYNCH, H.; PONDER, B.A.J.; GAYTHER, S.A.; BIRCH, J.M.; LINDBLOM, A.; STOPPA-LYONNET, D.; BIGNON, Y.; BORG, A.; HAMANN,10 N. HAITES,25 R. J. SCOTT,26 C. M. MAUGARD,27 H. VASEN, U.; SEITZ, S.; CANNON-ALBRIGHT, L.A.; SCHOFIELD, A.; ZELADA-HEDMAN, M.; THE BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families **Am J Hum Genet**, 62:676–89, 1998.

GATTI, R. A.; BERKEL, I.; BODER, E.; BRAEDT, G.; CHARMLEY, P.; CONCANNON, P.; ERSOY, R.; FOROUD, T.; JASPERS, N. G. J.; LANGE, K.; LATHROP, G. M.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; O'CONNELL, P.; PATERSON, M.; SALSER, W.; SANAL, O.; SILVER, J.; SPARKES, R. S.; SUSI, E.; WEEKS, D. E.; WEI, S.; WHITE, R.; YODER, F. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. **Nature** 336: 577-580, 1988.

GATTI, R. A.; PETERSON, K. L.; NOVAK, J.; CHEN, X.; YANG-CHEN, L.; LIANG, T.; LANGE, E.; LANGE, K. Prenatal genotyping of ataxia-telangiectasia. (Letter) **Lancet**, 342: 376, 1993.

GILAD, S.; KHOSRAVI, R.; SHKEDY, D.; UZIEL, T.; ZIV, Y.; SAVITSKY, K.; ROTMAN, G.; SMITH, S.; CHESSA, L.; JORGENSEN, T. J.; HARNIK, R.; FRYDMAN, M.; SANAL, O.; PORTNOI, S.; GOLDWICZ, Z.; JASPERS, N. G. J.; GATTI, R. A.; LENOIR, G.; LAVIN, M. F.; TATSUMI, K.; WEGNER, R. D.; SHILOH, Y.; BAR-SHIRA, A. Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. **Hum. Molec. Genet.** 5: 433-439, 1996.

INCA. – Instituto Nacional do Câncer Desenvolvido pelo Ministério da Saúde, 1996-2002. Apresenta dados e informações sobre as diversas formas de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/index.shtml>>. Acesso em: 08 set. 2003.

INCA. – Instituto Nacional do Câncer Desenvolvido pelo Ministério da Saúde, 1996-2005. Apresenta dados e informações sobre as diversas formas de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID1>. Acesso em: 26 jul. 2005.

INGVARSSON, S. Genetics of breast cancer. **Drugs Today (Barc)**. 40(12):991-1002, 2004.

KERR P. & ASHWORTH A. New complexities for BRCA1 and BRCA2 **Current Biology**, 11: R668–R676, 2001.

KAPP, L. N.; PAINTER, R. B.; YU, L.-C.; VAN LOON, N.; RICHARD, C. W., III; JAMES, M. R.; COX, D. R.; MURNANE, J. P. Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D. **Am. J. Hum. Genet.** 51: 45-54, 1992.

KHANNA, K.K. & JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet**, 27: 247-54, 2001.

KHANNA, K. K.; LAVIN, M. F.; JACKSON, S. P.; MULHERN, T. D.. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. **Cell Death Differ.** 8:1052–1065, 2001.

KHANNA, K.K. & TRENCH G.C. ATM and Genome Maintenance: Defining its role in breast cancer susceptibility. **J.Mamary Gland Biol. And Neoplasia**, 9 (3): 247-261, 2004.

KIRSCH, I.R. Genetics of human cancer: pathogenesis and diagnosis Keystone, Colorado, January 27-February 2, 1997. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1333: R1-R7, 1997.

LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, 256: 2037-48, 1994.

LEWIS, B.J.; CONRY, R.M. Câncer de mama. In: BENETT, J.C.; PLUM, F. **Tratado de medicina interna**. 20^a, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. pp. 1461-66. v.2.

LI, S.; TING, N. S. Y.; ZHENG, L.; CHEN, P.-L.; ZIV, Y.; SHILOH, Y.; LEE, E. Y.-H. P.; LEE, W.-H. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. **Nature** 406: 210-215, 2000.

MATSUOKA, S.; HUANG, M.; ELLEDGE, S.J. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase **Science**, 282: 1893-97, 1998.

MOTOYAMA, N. & NAKA, K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. **Curr Opin Genet Dev**. 14(1):11-6, 2004.

NCI. – National Cancer Institute. Desenvolvido pelo National Institutes of Health. Apresenta dados e informações sobre os diversos tipos de câncer nos Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.nci.nih.gov/>>. Acesso em: 10 set. 2002.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network. Apresenta dados sobre cânceres e critérios de inclusão utilizados neste instituto nos Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.nccn.org/>>. Acesso em: 13 mar. 2003.

NELEN, M.R.; PADBERG, G.W.; PEETERS, E.A.; LIN, A.Y.; VAN DEN HELM, B.; FRANTS, R.R.; COULON, V.; GOLDSTEIN, A.M.; VAN REEN, M.M.; EASTON, D.F.; EELES, R.A.; HODGSEN, S.; MULVIHILL, J.J.; MURDAY, V.A.; TUCKER, M.A.; MARIMAN, E.C.; STARINK, T.M.; PONDER, B.A.; ROPERS, H.H.; KREMER, H.; LONGY, M.; ENG, C. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. **Nat Genet**, 13(1):114-6, 1996.

NHGRI. – National human genome research institute. The Breast Cancer Information Core Database. Disponível em: <<http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/index.shtml>>. Acesso em: 08 set. 2002.

PETO, J. & MACK, T.M. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer **Nat Genet**, 26: 411-14, 2000.

SAVITSKY, K.; BAR-SHIRA, A.; GILAD, S.; ROTMAN, G.; ZIV, Y.; VANAGAITE, L.; TAGLE, D. A.; SMITH, S.; UZIEL, T.; SFEZ, S.; ASHKENAZI, M.; PECKER, I. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. **Science** 268: 1749-1753, 1995a.

SAVITSKY, K.; SFEZ, S.; TAGLE, D. A.; ZIV, Y.; SARTIEL, A.; COLLINS, F. S.; SHILOH, Y.; ROTMAN, G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. **Hum. Molec. Genet.** 4: 2025-2032, 1995b.

SCHAFFNER, C.; IDLER, I.; STILGENBAUER, S.; DOHNER, H.; LICHTER, P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 97: 2773-2778, 2000.

SCHAFFNER, C.; STILGENBAUER, S.; RAPPOLD, G. A.; DOHNER, H.; LICHTER, P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 94: 748-753, 1999.

SCOTT, S. P.; BENDIX, R.; CHEN, P.; CLARK, R.; DORK, T.; LAVIN, M. F. Sentido trocado mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 99: 925-930, 2002.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Molecular markers associated with node negative breast cancer. **Rev. Bras. Cancro.** 48 (1): 39-48, 2002.

Sociedade Portuguesa de Senologia. Apresenta dados de pesquisas com cânceres em Portugal, dentre estes critérios de inclusão utilizados. Disponível em: <<http://www.spsenologia.pt/>>. Acesso em: 17 mar. 2003.

STILGENBAUER, S.; WINKLER, D.; OTT, G.; SCHAFFNER, C.; LEUPOLT, E.; BENTZ, M.; MOLLER, P.; MULLER-HERMELINK, H.-K.; JAMES, M. R.; LICHTER, P.; DOHNER, H. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. **Blood**, 94: 3262-3264, 1999.

SZABO, C. I.; SCHUTTE, M., BROEKS, A.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.; THORSTENSON, Y. R.; DUROCHER, F; *et al.* Are *ATM* Mutations 7271T3G and IVS10–6T3G Really High-Risk Breast Cancer-Susceptibility Alleles? **Cancer Research** 64, 840–843, 2004.

TERAOKA, S. N.; TELATAR, M.; BECKER-CATANIA, S.; LIANG, T.; ONENGUT, S.; TOLUN, A.; CHESSA, L.; SANAL, O.; BERNATOWSKA, E.; GATTI, R. A.; CONCANNON, P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, *ATM*: underlying mutations and consequences. **Am. J. Hum. Genet.** 64: 1617-1631, 1999.

THOMPSON, D.; ANTONIOU, A. C.; JENKINS, M.; MARSH, A.; CHEN, X.; WAYNE, T.; TESORIERO, A.; MILNE, R.; SPURDLE, A.; THORSTENSON, Y.; SOUTHEY, M.; GILES, G. G.; KHANNA, K. K.; SAMBROOK, J.; OEFNER, P.; GOLDFAR, D.; HOPPER, J.L.; EASTON, D.; CHENEVIX-TRENCH, G. Two *ATM* variants and breast cancer risk. **Hum Mutat.**25(6):594-5, 2005a.

THOMPSON, D.; DUEDAL, S.; KIRNER, J.; McGUFFOG, L.; LAST, J.; REIMAN, A.; TAYLOR, P. B. M.; EASTON, D.F. Cancer Risks and Mortality in Heterozygous *ATM* Mutation Carriers. **J. Nat. Cancer Inst.** 97 (11): 813-22, 2005b.

THOMPSON, D. & EASTON, D. The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes. **J. Mamm. Gland Biol. Neoplas.** 9 (3): 221-35, 2004.

THORSTENSON, Y.R.; ROXAS, A.; KROISS, R.; JENKINS, M.A.; YU, K.M.; BACHRICH, T.; MUHR, D.; WAYNE, T.L.; CHU, G.; DAVIS, R.W.; WAGNER, T.M.; OEFNER, P.J. Contributions of *ATM* mutations to familial breast and ovarian cancer. **Cancer Res.** 15;63(12):3325-33, 2003.

TOMKA, M.; SEDLAKOVA, O.; REINEROVA, M.; VESELOVSKA, Z.; STEVURKOVA, V.; BARTOSOVA, Z.; ZAJAC, V. Mutation screening of the *BRCA1* gene in Slovak patients. **Neoplasma**, 48(6): 451-5 2001.

UMESAKO, S.; FUJISAWA, K.; IIGA S, MORI, N.; TAKAHASHI, M.; HONG, D.P.; SONG, C.W.; HAGA, S.; IMAI, S.; NIWA, O.; OKUMOTO, M. *Atm* heterozygous deficiency enhances development of mammary carcinomas in *p53* heterozygous knockout mice. **Breast Cancer Res.**;7(1):R164-70, 2005.

UZIEL, T.; SAVITSKY, K.; PLATZER, M.; ZIV, Y.; HELBITZ, T.; NEHLS, M.; BOEHM, T.; ROSENTHAL, A.; SHILOH, Y.; ROTMAN, G. Genomic organization of the ATM gene. **Genomics**, 33: 317-320, 1996.

VORECHOVSKY, I.; LUO, L.; DYER, M. J. S.; CATOVSKY, D.; AMLOT, P. L.; YAXLEY, J. C.; FORONI, L.; HAMMARSTROM, L.; WEBSTER, A. D. B.; YUILLE, M. A. R. Clustering of sentido trocado mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. **Nature Genet.** 17: 96-99, 1997.

WANG, Y.; CORTEZ, D.; YAZDI, P.; NEFF, N.; ELLEDGE, S.J. ; QIN, J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures **Genes & development**, 14: 927-39, 2000.

WELCSH, P.L.; OWENS, K.N.; KING M.C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. **Trends Genet**, 16(2):69-74, 2000.

WILSON, C.A.; RAMOS, L.; VILLASEÑOR, M.R.; ANDERS, K.H.; PRESS, M.F.; CLARKE, K.; KARLAN, B.; CHEN, J.J.; SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.; ZUCH, R.H.; KANTER, M.H.; COHEN, S.; CALZONE, F.J.; SLAMON, D.J. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas **Nat Genet**, 21: 236-40, 1999.

WU, X.; RANGANATHAN, V.; WEISMAN, D. S.; HEINE, W. F.; CICCONE, D. N.; O'NEILL, T. B.; CRICK, K. E.; PIERCE, K. A.; LANE, W. S.; RATHBUN, G.; LIVINGSTON, D. M.; WEAVER, D. T. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. **Nature**. 405: 477-482, 2000.

YARDEN, R.I.; PARDO-REOYO, S.; SGAGIAS, M.; COWAN, K.H.; BRODY, L.C. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. **Nat Genet.** 30 (3):285-9, 2002.

ANEXOS



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925

CEP, 17/12/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 535/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM MULHERES COM CARCINOMA DE MAMA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rozany Mucha Dufloth

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/11/2002

II - OBJETIVOS

Estimar a prevalência de diferentes polimorfismos nos genes de reparo do DNA e verificar se estão associados com algumas características genotípicas, antecedentes familiares da mulher, e com características morfológicas e histoquímicas do carcinoma.

III - SUMÁRIO

Estudo transversal, com 60 mulheres, com diagnóstico de câncer de mama admitidas no Ambulatório de Oncologia Mamária do CAISM. Serão estudados DNA de sangue periférico para análise de PCR-RFLP e de mutações genéticas. As técnicas moleculares serão realizadas no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade de Porto (ITATIMUP), correspondendo a doutorado "sanduíche". Metodologia adequada, assim como critérios de inclusão.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Protocolo para bolsa "sanduíche" de doutoramento com metodologia avançada, sem riscos para o paciente. Termo de consentimento adequado. O trabalho tem um orçamento de R\$ 3400,00 que serão solicitados à FAEP, sendo que as técnicas de Biologia Molecular serão financiadas por recursos de projeto em andamento no Instituto de Patologia e IMUNOLOGIA Molecular da Universidade do Porto.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Título do projeto: Análise da mutação S707P no gene ATM em pacientes portadores de câncer de mama.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Câncer de Mama. O objetivo geral do estudo é o de procurar portadores para mutações no gene ATM, que pode estar contribuindo para o quadro clínico de câncer de mama. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será colhida uma amostra de sangue venoso (30 mL, o equivalente a dez colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 30 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta mutação. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderá contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8907 (Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a)_____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG participante (ou responsável)

Data

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Departamento de Genética Médica

FICHA DE COLETA DE DADOS.

Título do projeto: Análise da mutação S707P no gene ATM em pacientes portadores de câncer de mama familiar.

Dados pessoais:

Número do caso: _____ Matrícula(HC): _____

Nome: _____ Fone: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Nacionalidade: _____ Origem étnica: _____

Data de nascimento: _____

Data da entrevista: _____

Informações clínicas pessoais:

CARCINOMA DE MAMA: ☐ SIM ☐ NÃO

CARCINOMA BILATERAL: ☐ SIM ☐ NÃO

Outro Carcinoma: ☐ Sim ☐ Não

☐ Ovário ☐ Cólon ☐ Próstata

☐ _____.

Exposição a agentes teratogênicos:

☐ 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().

Informações clínicas familiares:

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

Grau de parentesco:

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

2º grau: () avô () avó () tio (a) () primo (a) () neto (a)

3º grau _____ Quantos? _____

Familiares com outro carcinoma: () Sim () Não

Qual? _____.

Consangüinidade: Quem? _____

Heredograma:

Observações:

Laudo anátomo-patológico

Número do Exame I_____ I Emissão I_I_I_I_I_I_I_I

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

Laudo imunoistoquímico:

Número do Exame I_____ I Emissão I_I_I_I_I_I_I_I

Receptores estrogênicos () Positivo () Negativo

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

Observações:

Biologia Molecular:

Arg399Gln (exon10) localizado no gene XRCC1: () Presente () Ausente

135 C/G localizado no gene Rad51: () Presente () Ausente

Lys751Gln localizado no gene XPD: () Presente () Ausente

Thr241Met localizado no gene XRCC3: () Presente () Ausente

Mutações no gene BRCA1: () Presente () Ausente

Mutações no gene BRCA2: () Presente () Ausente

Observações:

Dados dos participantes com Câncer de mMama com Histórico familiar coletado a partir da ficha clínica (Anexo 3)

NUNGENET	IDADE	IDADIAG	CARCIN	CARCINBI	OUTRCA	OVARIO	PARENPRI	PARENSEG	TIPOHIST	GRUPO	SUBINTRA	GRAD	RE	RP	CERB	P53	ATM
1033/03	40	33	S	N	N	N	1	0	4	1	0	3	2	2	2	2	N/N
1037/03	54	45	S	N	N	N	1	1	4	1	0	2	0	0	0	0	N/N
1043/03	52	46	S	S	N	S	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1046/03	79	74	S	S	N	N	0	0	4	1	0	2	2	3	0	0	N/N
1048/03	44	41	S	N	N	N	0	1	4	1	0	2	1	1	0	0	N/N
1053/03	69	63	S	N	N	N	1	0	4	1	2.5.6	2	1	1	0	0	N/N
1068/03	63	56	S	N	N	N	0	4	9	1	8	4	2	2	2	0	N/N
0010/03	48	42	S	N	N	N	1	3	4	1	0	2	0	0	0	0	N/N
1088/03	50	41	S	S	N	N	1	0	1	1	1	3	2	2	0	0	N/N
1093/03	76	73	S	N	N	N	0	1	4	1	0	3	1	1	0	0	N/N
1104/03	53	41	S	S	N	N	0	2	4	1	0	2	0	0	0	0	N/N
1173/03	83	73	S	N	S	N	1	0	4	1	SD	SD	1	1	2	1	N/N
1169/03	59	56	S	N	N	N	0	4	4	1	8	3	0	0	0	0	N/N
1462/03	32	25	S	N	N	N	0	2	4	1	SD	3	SD	SD	SD	SD	N/N
1543/03	61	59	S	N	N	N	1	0	4	1	2	2	1	0	1	0	N/N
1717/03	66	50	S	N	N	N	1	0	4	1	SD	2	SD	SD	SD	SD	N/N
0321/04	47	44	S	N	N	S	5	2	4	1	9	3	2	2	0	SD	N/N
0416/04	53	46	S	S	N	N	1	0	4	1	8	3	2	2	0	SD	N/N
0426/04	62	55	S	N	N	N	1	0	4	1	8	2	0	0	0	SD	N/N
0445/04	40	37	S	N	N	N	1	0	SD	1	SD	SD	SD	SD	SD	SD	N/N
0443/04	57	54	S	S	N	S	1	0	4	1	8	3	2	2	1	1	N/N
0477/04	48	0	S	N	N	N	1	2	0	2	SD	SD	SD	SD	SD	SD	N/N
0520/04	50	49	S	N	N	N	1	2	1	1	SD	3	1	1	1	1	N/N
0716/04	41	40	S	N	N	N	2	1	4	1	8	2	1	1	2	SD	N/N
0719/04	41	41	S	N	N	N	0	1	4	1	8	3	0	0	0	SD	N/N
0770/04	63	61	S	N	N	N	1	0	4	1	8	2	1	1	0	0	N/N
0829/04	62	56	S	N	N	S	0	1	4	1	8	2	2	2	0	0	N/N
0838/04	28	23	S	N	N	N	0	2	4	1	8	2	0	0	0	0	N/N

Dados dos participantes com Câncer de mMama sem Histórico familiar coletado a partir da ficha clínica (Anexo 3)

NUNGENET	IDADE	IDADIAG	CARCIN	CARCINBI	OUTRCA	OVARIO	TIPOHIST	GRUPO	SUBINTRA	GRADAC	RE	RP	CERB	P53	ATM
0142/04	56	55	S	N	N	N	1	3	9	3	0	0	0	SD	N/N
0322/04	53	52	S	N	N	N	1	3	1	3	0	0	0	SD	N/N
0329/04	51	50	S	N	N	N	4	3	8	2	2	2	2	SD	N/N
0330/04	68	68	S	N	N	N	4	3	8	2	0	0	0	SD	N/N
0331/04	42	41	S	N	N	N	4	3	8	3	0	0	0	SD	N/N
0332/04	39	38	S	N	N	N	1	3	8	3	0	0	0	SD	N/N
0368/04	48	45	S	N	N	N	4	3	4	3	1	1	0	SD	N/N
0425/04	42	37	S	N	N	N	4	3	8	5	1	1	0	SD	N/N
0430/04	44	39	S	N	N	N	4	3	8	3	2	1	0	SD	N/N
0431/04	49	45	S	N	N	N	4	3	8	2	0	0	0	SD	N/N
0432/04	57	48	S	S	N	N	4	1	8	2	1	1	SD	SD	N/N
0444/04	31	29	S	N	N	N	4	1	1	3	1	1	1	2	N/N
0446/04	59	58	S	S	N	N	4	1	4	3	SD	SD	SD	SD	N/N
0475/04	76	66	S	N	N	N	4	3	8	2	0	0	0	0	N/N
0478/04	49	45	S	N	N	N	4	3	8	3	2	1	0	0	N/N
0519/04	35	31	S	N	N	N	4	1	8		1	1	0	SD	N/N
0715/04	36	27	S	N	N	N	4	1	8	3	2	2	2	2	N/N
0720/04	46	43	S	N	N	N	4	3	8	3	2	2	0	SD	N/N
0721/04	47	26	S	N	N	N	4	3	8	2	0	0	SD	SD	N/N
0724/04	50	47	S	N	N	N	4	3	8	2	1	1	0	0	N/N
0742/04	58	54	S	N	N	N	4	3	8	2	1	1	2	2	N/N
0743/04	52	49	S	N	N	N	4	3	8	2	1	1	0	0	N/N
0744/04	64	61	S	N	S	S	4	1	8	2	1	1	0	0	N/N
0746/04	49	49	S	N	N	N	6	3	SD	SD	SD	SD	SD	SD	N/N
0747/04	55	43	S	N	N	N	4	3	8	1	0	0	0	0	N/N
0748/04	46	29	S	N	N	N	4	3	8	2	0	0	0	0	N/N
0769/04	65	50	S	N	N	N	6	3	8	4	0	0	0	0	N/N
0772/04	53	49	S	N	S	N	9	4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	N/N
0835/04	58	40	S	N	N	N	1	3	8	3	0	0	0	0	N/N
0836/04	50	43	S	N	N	N	1	3	8	4	0	0	0	0	N/N
0837/04	47	40	S	N	N	N	1	3	8	3	0	0	0	0	N/N

1035/03	64	43	S	S	N	N	9	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1036/03	59	46	S	S	N	N	4	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1044/03	30	23	S	N	N	N	1	1	1	3	2	2	0	2	N/N
1045/03	42	35	S	S	N	N	6	1	0	4	1	1	2	1	N/N
1050/03	24	19	S	N	N	N	12	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1052/03	41	29	S	N	N	N	4	1	0	2	0	0	0	0	N/N
1077/03	48	44	S	N	N	N	4	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1080/03	59	41	S	S	N	N	4	1	0	3	0	0	0	0	N/N
1081/03	35	31	S	N	N	N	1	1	1	2	1	1	0	0	N/N
1087/03	36	29	S	N	N	N	4	1	0	3	0	0	0	0	N/N
1091/03	54	51	S	N	N	N	6	3	0	4	1	1	0	0	N/N
1092/03	72	68	S	N	N	N	8	3	0	4	0	0	0	0	N/N
1103/03	63	60	S	N	N	N	10	3	3	4	SD	SD	SD	SD	N/N
1154/03	69	65	S	N	N	N	4	1	SD	3	1	1	SD	SD	N/N
1172/03	30	28	S	N	N	N	4	1	SD	3	SD	SD	SD	SD	N/N
1533/03	49	47	S	N	N	N	10	3	8	4	0	0	SD	SD	N/N
1650/03	38	36	S	N	N	N	4	3	SD	2	1	1	SD	SD	N/N
1651/03	44	42	S	N	N	N	12	3	SD	3	SD	SD	SD	SD	N/N
1714/03	51	45	S	N	N	N	4	3	9	2	1	1	SD	SD	N/N

1034/03	37	33	S	N	N	N	0	1	4	1	1.2.5.	3	1	1	0	0	N/N
1038/03	51	46	S	N	N	S	1	0	4	1	2	2	1	1	0	0	N/N
1054/03	54	46	S	N	N	N	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	N/N
1107/03	72	69	S	N	N	S	0	1	4	1	SD	2	0	0	0	SD	N/N
0323/04	67	63	S	N	N	N	1	0	4	1	9	2	1	1	0	SD	N/N
0320/04	46	45	S	N	N	N	1	0	4	1	9	2	0	0	0	SD	N/N
0366/04	49	45	S	N	N	N	1	1	4	1	8	2	1	1	1	SD	N/N
0367/04	53	38	S	S	N	N	1	1	4	1	8	1	0	0	0	SD	N/N
0417/04	62	46	S	N	N	N	1	0	4	1	8	1	0	0	0	SD	N/N
0418/04	34	32	S	N	N	N	0	1	4	1	SD	2	1	2	0	SD	N/N
0474/04	55	0	S	S	N	N	2	0	4	2	8	3	1	1	0	0	N/N
0476/04	77	66	S	N	N	N	0	1	4	1	8	2	1	0	0	SD	N/N
0722/04	40	40	S	N	N	N	1	1	4	1	8	3	2	2	1	1	N/N
0723/04	49	43	S	N	N	N	0	1	9	1	8	3	0	0	0	0	N/N
0725/04	41	40	S	N	N	N	1	2	4	1	1	3	2	2	0	0	N/N
0745/04	46	31	S	N	N	N	0	1	4	1	8	1	0	0	0	0	N/N
0774/04	65	59	S	N	N	N	1	0	4	1	8	3	0	0	0	0	N/N
0773/04	62	54	S	N	N	N	1	0	4	1	8	SD	0	0	0	0	N/N
0831/04	37	35	S	N	N	N	0	0	1	1	8	3	2	0	0	0	N/N
0833/04	67	67	S	N	N	S	0	1	9	1	8	3	2	1	1	1	N/N
0834/04	50	47	S	N	N	N	0	1	4	1	8	3	1	1	2	2	N/N

Dados dos participantes sem Câncer de mMama sem Histórico familiar coletado a partir da ficha clínica (Anexo 3).

NUMGENET	IDADE	CARCIN	CAFAMIL	OVARIO	PARENPRI	GRUPO	ATM
1912/03	32	N	N	N	0	4	N/M
1751/03	49	N	N	N	0	4	N/M
1098/03	37	N	N	N	0	4	N/N
1101/03	30	N	N	N	0	4	N/N
1102/03	46	N	N	N	0	4	N/N
1116/03	23	N	N	N	0	4	N/N
1118/03	23	N	N	N	0	4	N/N
1120/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1125/03	35	N	N	N	0	4	N/N
1128/03	58	N	N	N	0	4	N/N
1129/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1132/03	45	N	N	N	0	4	N/N
1133/03	51	N	N	N	0	4	N/N
1136/03	52	N	N	N	0	4	N/N
1137/03	30	N	N	N	0	4	N/N
1139/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1140/03	39	N	N	N	0	4	N/N
1155/03	28	N	N	N	0	4	N/N
1166/03	57	N	N	N	0	4	N/N
1914/03		N	N	N	0	4	N/N
1521/03	63	N	N	N	0	4	N/N
1536/03	23	N	N	N	0	4	N/N
1542/03	57	N	N	N	0	4	N/N
1541/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1532/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1567/03	27	N	N	N	0	4	N/N
1568/03	44	N	N	N	0	4	N/N
1571/03	45	N	N	N	0	4	N/N
1572/03	61	N	N	N	0	4	N/N
1656/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1653/03	47	N	N	N	0	4	N/N
1090/03	49	N	N	N	0	4	N/N
1657/03	45	N	N	N	0	4	N/N
1658/03	36	N	N	N	0	4	N/N
1665/03	50	N	N	N	0	4	N/N
1666/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1667/03	53	N	N	N	0	4	N/N
1668/03	52	N	N	N	0	4	N/N
1673/03	51	N	N	N	0	4	N/N
1674/03	62	N	N	N	0	4	N/N
1677/03	45	N	N	N	0	4	N/N

1678/03	55	N	N	N	0	4	N/N
1679/03	52	N	N	N	0	4	N/N
1680/03	48	N	N	N	0	4	N/N
1699/03	52	N	N	N	0	4	N/N
1701/03	76	N	N	N	0	4	N/N
1776/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1774/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1771/03	33	N	N	N	0	4	N/N
1770/03	40	N	N	N	0	4	N/N
1769/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1768/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1767/03	39	N	N	N	0	4	N/N
1766/03	38	N	N	N	0	4	N/N
1764/03	49	N	N	N	0	4	N/N
1759/03	74	N	N	N	0	4	N/N
1756/03	43	N	N	N	0	4	N/N
1755/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1745/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1744/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1736/03	31	N	N	N	0	4	N/N
1731/03	45	N	N	N	0	4	N/N
1727/03	39	N	N	N	0	4	N/N
1730/03	53	N	N	N	0	4	N/N
1729/03	61	N	N	N	0	4	N/N
1728/03	44	N	N	N	0	4	N/N
1795/03	25	N	N	N	0	4	N/N
1805/03	53	N	N	N	0	4	N/N
1809/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1545/03	51	N	N	N	0	4	N/N
1547/03	47	N	N	N	0	4	N/N
1550/03	40	N	N	N	0	4	N/N
1552/03	100	N	N	N	0	4	N/N
1922/03	29	N	N	N	0	4	N/N
1924/03	35	N	n	N	0	4	N/N
1926/03	29	N	N	N	0	4	N/N
1928/03	22	N	n	n	0	4	N/N
1929/03	21	N	N	N	0	4	N/N
1053/04	22	N	N	N	0	4	N/N
1054/04	21	N	N	N	0	4	N/N
1055/04	46	N	N	N	0	4	N/N
1056/04	44	N	N	N	0	4	N/N
0001/04	35	N	N	N	0	4	N/N
1097/03	56	N	N	N	0	4	N/N
1099/03	39	N	N	N	0	4	N/N
1100/03	47	N	N	N	0	4	N/N

1108/03	36	N	N	N	0	4	N/N
1113/03	43	N	N	N	0	4	N/N
	44	N	N	N	0	4	N/N
1122/03	23	N	N	N	0	4	N/N
1135/03	56	N	N	N	0	4	N/N
1141/03	24	N	N	N	0	4	N/N
1142/03	27	N	N	N	0	4	N/N
1153/03	33	N	N	N	0	4	N/N
1164/03	27	N	N	N	0	4	N/N
1913/03		N	N	N	0	4	N/N
1530/03	58	N	N	N	0	4	N/N
1538/03	40	N	N	N	0	4	N/N
1565/03	48	N	N	N	0	4	N/N
156603	37	N	N	N	0	4	N/N
1654/03	47	N	N	N	0	4	N/N
1676/03	44	N	N	N	0	4	N/N
1700/03	45	N	N	N	0	4	N/N
1775/03	39	N	N	N	0	4	N/N
1772/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1763/03	43	N	N	N	0	4	N/N
1762/03	38	N	N	N	0	4	N/N
1758/03	41	N	N	N	0	4	N/N
1754/03	22	N	N	N	0	4	N/N
1753/03	47	N	N	N	0	4	N/N
1752/03	22	N	N	N	0	4	N/N
1750/03	65	N	N	N	0	4	N/N
1743/03	59	N	N	N	0	4	N/N
1735/03	67	N	N	N	0	4	N/N
1734/03	69	N	N	N	0	4	N/N
1732/03	32	N	N	N	0	4	N/N
1802/03	50	N	N	N	0	4	N/N
1803/03	42	N	N	N	0	4	N/N
1548/03	61	N	N	N	0	4	N/N
1934/03	29	N	N	N	0	4	N/N
0881/04	55	N	N	N	0	4	N/N
0002/04	27	N	N	N	0	4	N/N

Legenda das tabelas

NUMGENET = Número do indivíduo;

IDADE = Idade Do Indivíduo;

IDADIAG = Idade do diagnóstico do carcinoma da mama;

CARCIN = Carcinoma: Sim (Presente) ; Não (Ausente);

CARCIBI = Carcinoma bilateral;

OUTRCA = Outro carcinoma;

CAFAMIL = Carcinoma na família;

OVÁRIO = Carcinoma de ovário;

PARENPRI = Parente de primeiro grau com carcinoma (mãe, irmã, filha);

PARENSEG = Parente de segundo grau com carcinoma (Vó, tia, prima, neta);

TIPOHIST = Tipo histológico do carcinoma de mama;

SUBINTRA = Subtipo histológico do carcinoma intraductal;

GRADAÇ = Gradação (do carcinoma invasivo);

RE = Receptor de estrógeno;

RP = Receptor de progesterona;

CERB = Expressão da proteína c-erb-B2;

ATM = Presença de alelos mutados para S707P.

M= Presente N=Ausente 0=Não avaliado SD= Sem dados

Grau de parentesco (primeiro, segundo e terceiro grau)

(0) Nenhum familiar com carcinoma; (1) 1 familiar com carcinoma; (2) 2 familiares com carcinoma; (3) 3 ou mais familiares com carcinoma; (4) ca de mama masculino na família.

Tipo histológico:

(0) Sem carcinoma; (1) Ca ductal *in situ*; (2) Ca lobular *in situ*; (3) Doença de Paget do mamilo sem tumor associado; (4) Ca ductal invasivo; (5) Ca ductal invasivo com componente intraductal predominante; (6) Ca lobular invasivo; (7) Ca tubular; (8) Ca mucoso(colóide); (9) Ca medular; (10) Ca papilífero; (11) Ca inflamatório; (12) Outro.

Subtipo histológico do carcinoma intraductal:

(1) Comedo; (2) Cribiforme; (3) Intracístico; (4) Micropapilífero; (5) Sólido; (6) Papilífero; (7) Aderente *clinging*; (8) Não avaliável. (9) Outro.

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

(1) Grau 1; (2) Grau 2; (3) Grau 3; (4) Não aplicável.

Receptores estrogênicos:

(1) Positivo; (2) Negativo; (3) ca bilateral mais em uma mama que na outra.

Expressão da proteína c-erb-B2:

(1) Positivo; (2) Negativo.