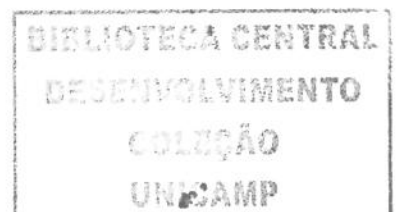


GUSTAVO JACOB LOURENÇO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO D104N DO
GENE *COL18A1* NA SUSCEPTIBILIDADE AO
CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

CAMPINAS

2006



GUSTAVO JACOB LOURENÇO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO D104N DO
GENE *COL18A1* NA SUSCEPTIBILIDADE AO
CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

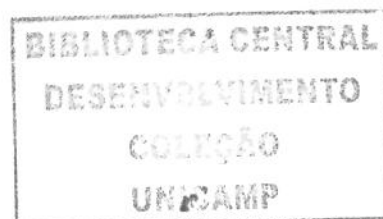
*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Clínica Médica, área de concentração
Clínica Médica*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

CAMPINAS

2006

iii



UNIDADE BC
 CHAMADA
T/UNICAMP
L934
 EX
 OMBO BC/ 69143
 ROC. 16.123.06
 C ☐ D ☒
 REÇO 21.00
 ATA 29-06-06

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

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

Bib ID 383063

L932i

Lourenço, Gustavo Jacob

Influência do poliformismo D104N do gene *COL 18A1* na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico. / Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Carmen Silvia Passos Lima
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias mamárias. 2. Neovascularização patológica. 3. Polimorfismo (genética). I. Lima, Carmen Silvia Passos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/FCM)

Título em inglês: *Influence of the D104N do gene COL18A1 gene in sporadic breast cancer susceptibility*

Keywords:

- *Breast neoplasms*
- *Neovascularization pathologic*
- *Polimorphism (genetics)*

Área de concentração: Clínica médica

Titulação: Mestrado

Banca examinadora:

Profª. Drª. Carmen Silvia Passos Lima

Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira

Profª. Drª. Mônica Barbosa de Mello

Data da defesa: 26 / 01 / 2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Passos Lima

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Mônica Barbosa de Melo

2. Prof(a). Dr(a). Luiz Carlos Teixeira

3. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/01/2006

200613599

À **Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**, pela orientação, apoio e amizade, sem os quais eu não teria terminado minha dissertação.

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa** pelo apoio através da cessão de materiais e do laboratório, essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

A **Dra. Maria Salete Costa Gurgel, Dr. Cassio Cardoso Filho** e enfermeiras do Departamento de Tocoginecologia do CAISM da UNICAMP, pela ajuda na obtenção das amostras das pacientes e na compreensão de aspectos relacionados à doença.

À **Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves e Máira Helena Cittadino Favarelli**, do laboratório de Sorologia do Hemocentro, pela ajuda na padronização da técnica ELISA.

À **Dra. Glauce Aparecida Pinto**, e todo pessoal do laboratório de Patologia Experimental do CAISM pela ajuda na padronização da técnica de imuno-histoquímica

Ao estatístico **Roberto**, pela paciência e dedicação nas análises dos dados referentes aos nossos resultados.

À **Manoela**, à **Helvia**, à **Luciana**, à **Priscilla**, à **Iramaia**, à **Bárbara**, ao **Sandro**, ao **Anderson** e todo pessoal do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, pela ajuda e amizade inestimáveis, fundamentais no desenvolvimento do meu trabalho.

Às **meninas** do laboratório de Citogenética do Hemocentro, pelo apoio e amizade.

À **Teca**, pela triagem, identificação e coleta de sangue dos controles.

Aos meus **pais**, à minha **irmã** e a todos os meus **familiares**, pelo apoio incondicional sem o qual eu não teria chegado até aqui.

A realização deste estudo contou com o apoio da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*"Se não houver frutos, valeu a beleza das flores. . .
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas . . .
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente . . ."*

Henfil

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxvii</i>
INTRODUÇÃO	31
1- Considerações gerais	33
2- Aspectos clínicos	34
3- Fatores prognósticos	35
3.1- Fatores anátomo-patológicos do tumor.....	35
3.2- Fatores biológicos do tumor.....	36
3.3- Aspectos genéticos e moleculares.....	37
4- Angiogênese em câncer de mama	37
4.1- Endostatina.....	38
4.2- Polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i>	39
OBJETIVOS	41
CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
1- Avaliação clínica	47
2- Avaliação do tumor	48
2.1- Tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear e estágio.....	48
2.2- Receptores hormonais.....	53
2.2.1- Preparação dos cortes histológicos.....	54
2.2.2- Reação de imunoperoxidase e coloração.....	54

3- Análise molecular do gene <i>COL18A1</i>	55
3.1- Identificação do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i>	55
3.1.1- Extração de DNA a partir de leucócitos.....	55
3.1.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	56
3.1.3- Digestão enzimática.....	57
4- Quantificação da endostatina sérica	57
4.1- Preparação dos padrões da endostatina.....	58
4.2- Quantificação da endostatina por ELISA.....	58
5- Aspectos éticos	59
6- Análise estatística	60
RESULTADOS	61
1- Avaliação clínica	63
2- Avaliação do tumor	65
2.1- Tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear e estágio.....	65
2.2- Receptores hormonais.....	67
3- Análise molecular do gene <i>COL18A1</i>	67
3.1- Polimorfismo D104N em pacientes e controles.....	67
3.2- Polimorfismo D104N e aspectos clínicos.....	70
3.3- Polimorfismo D104N e aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor.....	71
4- Quantificação da endostatina sérica	73
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	109

CM	Câncer de mama
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
ES	Endostatina
kDa	Kilodaltons
<i>COL18A1</i>	Gene codificador do colágeno XVIII
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
D104N	Polimorfismo do gene <i>COL18A1</i>
CME	Câncer de mama esporádico
TA	Temperatura ambiente
mM	Milimolar
μl	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ml	Mililitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
D	Alelo selvagem do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i>
N	Alelo polimórfico 104N do gene <i>COL18A1</i>
ng/ml	Nanograma/mililitro
OR	Razão das chances
IC	Intervalo de confiança
DP	Desvio padrão
pb	Pares de bases
CDI	Carcinoma ductal invasivo
DO	Densidade óptica

	Pág.
Tabela 1 Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer de mama.....	50
Tabela 2 Grupos de estágios e características TNM do câncer de mama.....	53
Tabela 3 Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com a idade, a raça, a menarca, a menopausa e a idade da primeira gestação.....	63
Tabela 4 Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com a lactação, a terapia de reposição hormonal e o hábito do tabagismo.....	64
Tabela 5 Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com o tipo histológico, o grau de diferenciação, o grau nuclear e o estágio TNM do tumor.....	66
Tabela 6 Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes com câncer de mama esporádico e em controles.....	70
Tabela 7 Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes estratificados por aspectos clínicos.....	71
Tabela 8 Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor.....	72
Tabela 9 Distribuições das concentrações dos seis padrões da endostatina de quatro kits e suas respectivas absorbâncias e médias, utilizadas para a realização dos gráficos padrão, por meio do método ELISA.....	73

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Produtos da amplificação do éxon 42 do gene <i>COL18A1</i>	68
Figura 2 Polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i>	69
Figura 3 Curva dos padrões das concentrações da endostatina - <i>kit</i> 1.....	75
Figura 4 Curva dos padrões das concentrações da endostatina - <i>kit</i> 2.....	75
Figura 5 Curva dos padrões das concentrações da endostatina - <i>kit</i> 3.....	76
Figura 6 Curva dos padrões das concentrações da endostatina - <i>kit</i> 4.....	76
Figura 7 Endostatina sérica em pacientes e controles.....	77
Figura 8 Endostatina sérica em pacientes estratificados por genótipos do gene <i>COL18A1</i>	78
Figura 9 Endostatina sérica em controles estratificados por genótipos do gene <i>COL18A1</i>	79

RESUMO

A angiogênese é um importante processo para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama esporádico (CME). Há evidências de que as células tumorais podem produzir proteínas antiangiogênicas como a endostatina (ES). A ES é codificada pelo gene *COL18A1*. Recentemente, um polimorfismo do gene *COL18A1*, o D104N, foi associado ao aumento do risco de ocorrência do adenocarcinoma de próstata. Considerando que não há descrições sobre a influência do polimorfismo D104N na susceptibilidade ao CME, este foi definido como o objetivo do estudo. Assim, o DNA genômico de 181 mulheres com CME e 448 controles foi analisado por meio da reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática com a enzima *MseI*. O método ELISA foi utilizado para a quantificação da ES sérica de 118 pacientes com CME e 158 controles. As amostras dos controles estiveram no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 2,15$; $P = 0,14$). Em contraste, as amostras das pacientes não confirmaram a expectativa de Hardy-Weinberg no locus D104N do gene *COL18A1* ($X^2 = 22,87$; $P < 0,0001$). Observamos que a frequência do polimorfismo 104NN foi maior em pacientes do que em controles (2,8% vs 0,0%; respectivamente). Os indivíduos com o genótipo NN apresentaram um risco infinitamente maior de ocorrência da doença do que aqueles com os outros genótipos ($P = 0,003$). As frequências do polimorfismo 104NN foram similares em pacientes estratificados por variáveis clínicas (idade, raça, idades da menarca, menopausa, da primeira gestação a termo, lactação, terapia de reposição hormonal e hábito de fumar) e laboratoriais (histologia, graus histológico e nuclear, padrão dos receptores de estrogênio e progesterona e estágio TNM do tumor). A mediana das concentrações da ES foi maior em pacientes do que em controles ($P < 0,001$). Valores similares foram encontrados em pacientes ($P > 0,759$) e controles ($P = 0,535$) estratificados por genótipos. Os nossos resultados sugerem que o polimorfismo 104NN do gene *COL18A1* está associado à susceptibilidade do CME, possivelmente devido à anormalidade funcional da proteína.

ABSTRACT

Angiogenesis is an important step in sporadic breast cancer (SBC) development and progression. There is evidence that neoplastic cells play a role in the generation of endogenous antiangiogenic proteins, such as endostatin (ES). ES is codified by the *COL18A1* gene. Recently, a *COL18A1* polymorphism (D104N) was associated with increased risk for the prostatic adenocarcinoma. Considering that it is unknown whether the D104N polymorphism of the *COL18A1* gene alters the risk for SBC, this was the aim of this study. Thus, genomic DNA from peripheral blood of 181 SBC women and 448 controls were analysed using the polymerase chain reaction followed by restriction endonuclease digestion with *MseI*. ELISA for quantification of ES was performed in serum from 118 SBC woman and 158 controls. Controls' samples were in Hardy-Weinberg equilibrium ($X^2= 2.15$, $P= 0.14$). In contrast, patients' samples did not confirm the Hardy-Weinberg expectations at the D104N locus ($X^2= 22.87$, $P< 0.0001$). We observed a higher frequency of 104NN polymorphism in SBC patients than in controls (2.8% vs 0.0%, respectively). Individuals with the 104NN polymorphism had an infinite risk for disease ($P= 0.003$) when compared with those with other genotypes. The frequencies of the 104NN polymorphism were similar in patients stratified by clinical (age, ethnical origin, ages of menarche, menopause, first full-term pregnancy, lactation, hormone replacement therapy, and smoke habit) and laboratory variables (tumour histology, histological and nuclear grades, status of estrogen and progesterone receptors, and stage TNM of the tumour). The median values of ES was higher in patients than in controls ($P< 0.001$). Similar median values of ES were seen among patients ($P> 0.759$) and controls ($P= 0.535$) stratified by genotypes. However, differences in clinical and laboratory manifestation and levels of ES may not have reached statistical significance due to the small number of individuals with the 104N allele, enrolled in study. Our results suggest that the 104NN genotype of the *COL18A1* gene is associated with SBC susceptibility, possibly due to an abnormal ES function.

INTRODUÇÃO

1- Considerações gerais

Acredita-se que o câncer humano ocorra devido a anormalidades que conferem, a algumas células, vantagens que são transmitidas às células filhas, dando origem a um clone celular que escapa aos controles de crescimento e diferenciação (NAMBA et al., 1990). Embora cerca de 350 bilhões de células se dividam no organismo adulto normal todos os dias, o aparecimento de um tumor é relativamente raro, devido aos mecanismos fisiológicos de reparo do ácido desoxirribonucléico dos núcleos celulares (WARD, 1997).

O câncer é a segunda causa de morte nos Estados Unidos, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2002). A mama, entre as mulheres, é a localização mais comum, uma vez que representa 32% do total de tumores registrados na população feminina. O câncer de mama (CM) determinou 18% dos óbitos nesse país no ano de 2000 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2002).

O câncer figura como a terceira principal causa de morte no Brasil, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e causas externas (acidentes de trânsito somado à violência urbana). A mama, entre as mulheres, é também a localização mais comum. A taxa de mortalidade por CM aumentou significativamente no país, nos últimos 20 anos. Foram registrados 5,77 óbitos por 100.000 mulheres, no ano de 1979 e 9,75 óbitos por 100.000 mulheres, no ano de 1999. Há expectativa de que tenham ocorrido dez óbitos por 100.000 mulheres no Brasil, no ano de 2004. O número de casos novos de CM esperados para o Brasil no ano de 2005 foi de 49.470, com um risco estimado de 53 casos a cada 100.000 mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2005).

O aumento da incidência da doença foi observado nos países em geral, incluindo os do hemisfério sul e da Ásia (KELSEY, 1993; YOSHIMOTO et al., 2004).

As razões para o aumento gradual, porém constante, da incidência do CM permanecem obscuras. Provavelmente resulta de múltiplos fatores, tais como o envelhecimento da população (KELSEY, 1993) e o estabelecimento de novos padrões reprodutivos e hormonais nas últimas décadas (HULKA & MOORMAN, 2001).

Os hormônios sexuais estão claramente associados ao desenvolvimento da doença, incluindo os próprios hormônios. Nesta linha torna-se explicável as associações epidemiológicas observadas entre a menarca precoce (antes dos 12 anos), a menopausa

tardia (após os 50 anos) e a idade tardia da primeira gestação a termo (após os 30 anos de idade) (PIKE et al., 1983; RUSSO & RUSSO, 1987; KELSEY, 1993; LIPPMAN, 2002; HULKA & MOORMAN, 2001; BREASTCANCER.ORG, 2005).

Por outro lado, não se encontram suficientemente esclarecidos os papéis da amamentação após a gestação (NEWCOMB et al., 1994; ALBREKTSEN et al., 2005), do uso de anticoncepcionais orais (KOPANS, 2000a; HULKA & MOORMAN, 2001; LIPPMAN, 2002), e da terapia de reposição hormonal após a menopausa (WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS, 2002; LIPPMAN, 2002; COLLINS et al., 2005) na origem da doença.

O CM é considerado um grave problema de saúde pública na maioria dos países do mundo, incluindo o Brasil (PARKER et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2005). A magnitude do problema encontra-se no diagnóstico da doença em fases avançadas, especialmente em mulheres de classes sócio-econômicas menos privilegiadas, quando o tratamento é pouco efetivo e as chances de cura são mínimas (WELLS & HORM, 1992; JOSLYN & WEST, 2000; GORDON, 2003).

2- Aspectos clínicos

O CM usualmente se apresenta como um nódulo ou uma tumoração não dolorosa em uma das mamas, acompanhada, em suas fases mais avançadas, de alterações da pele suprajacente ao tumor, tais como edema, retração e ulceração. A presença de linfadenomegalia axilar homolateral é sinal de disseminação da doença.

O CM é bilateral em cerca de 10% dos casos, sendo que os tumores podem ser sincrônicos, quando ambas as mamas estão afetadas no momento do diagnóstico ou assincrônicos, quando o tumor contra-lateral é diagnosticado após um ano do primeiro diagnóstico (BLAND & COPPELAND, 1994).

O CM acomete predominantemente mulheres após os 30 anos de idade. A incidência da doença aumenta com a idade. Cerca de 150 casos/100.000 mulheres/ano aos 40 anos, 250 casos/100.000 mulheres aos 50 anos/ano e 350 casos por 100.000 mulheres aos 60 anos/ano foram descritos por KOPANS (2000a).

O principal sistema de estadiamento do tumor utilizado para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser ministrada é o TNM, que neste estudo foi realizado segundo as normas do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SINGLETARY et al., 2002). Este sistema considera a extensão do acometimento do tumor na mama e em tecidos adjacentes (T), a identificação de metástases para linfonodos regionais (N) e a identificação da presença de metástases à distância (M). Oito estágios do tumor podem ser identificados (0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IIIc e IV), sendo 92%, 87%, 78%, 68%, 51%, 42% e 13%, as correspondentes probabilidades de sobrevivência em cinco anos para pacientes com cada estágio do tumor (KOPANS, 2000b).

A despeito dos avanços terapêuticos (procedimentos cirúrgicos, quimioterapia e radioterapia) e das tentativas de diagnóstico precoce da doença, apenas cerca de 50% das pacientes têm CM diagnosticado em fase ainda restrita à glândula mamária (tumores de estágios 0, I e alguns tumores do estágio IIa), para as quais a probabilidade de sobrevivência por período de cinco anos é maior do que 60%.

Estas descrições justificam a busca de maior conhecimento sobre a etiologia e a fisiopatologia da doença.

3- Fatores prognósticos

A evolução do CM é variável. Enquanto algumas pacientes apresentam longa sobrevivência livre de doença e global, outras apresentam recidivas precoces seguidas de óbito. Estas variações podem ser explicadas pelos chamados fatores prognósticos que conferem diferenças nas taxas de progressão do tumor e nos seus potenciais de invasão local e metastático (CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004).

Os fatores prognósticos são identificados no momento do diagnóstico. Podem ser classificados em fatores anátomo-patológicos e fatores biológicos do tumor.

3.1- Fatores anátomo-patológicos do tumor

O estado linfonodal axilar é considerado o mais importante fator prognóstico para pacientes com CM. A presença de linfonodo axilar comprometido pela doença constitui um fator prognóstico desfavorável (MITTRA et al., 1991; CIANFROCCA &

GOLDSTEIN, 2004). Ainda, a piora do prognóstico é diretamente proporcional ao número de linfonodos acometidos (FISHER et al., 1983; CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004).

O tamanho tumoral constitui o segundo fator prognóstico de importância da doença. Está inversamente relacionado com a sobrevivência de pacientes com CM (CLARK et al., 1996; VERSCHRAEGEN et al., 2005).

Um fator anátomo-patológico com importância prognóstica em CM é o tipo histológico do tumor. Os carcinomas mais prevalentes, dos tipos histológicos ductal invasivo (65 a 85% dos casos) e lobular invasivo (10 a 14% dos casos), são de prognóstico desfavorável. Já, outros tipos menos prevalentes, como o carcinoma medular (5 a 7% dos casos), o colóide (2% dos casos), o papilífero (1 a 2% dos casos) e o tubular (2% dos casos) são de prognóstico favorável (ROSEN & OBERMAN, 1993; MUSS, 2001; CAPONERO, 2003).

Um outro fator anátomo-patológico com importância prognóstica em CM é o grau de diferenciação do tumor. Significado prognóstico desfavorável foi atribuído aos tumores indiferenciados em comparação aos demais (BLOOM & RICHARDSON, 1957; FRIERSON et al., 1995; WOOD, 2005).

Ainda, a neoformação vascular parece influenciar a velocidade de crescimento tumoral. Foi demonstrado que uma maior densidade de microvasos no tecido tumoral esteve relacionada com a piora do prognóstico de pacientes com CM (GASPARINI et al., 1994; UZZAN et al., 2004).

3.2- Fatores biológicos do tumor

Os receptores hormonais para estrogênios e progesterona são considerados fatores prognósticos independentes no CM. Pacientes com receptores hormonais em células tumorais apresentaram maior sobrevivência do que aquelas em que os receptores não são identificados (ALLRED et al., 1998; GOLD et al., 2004; DICKSON, 2005), uma vez que apresentaram melhor resposta a tratamentos anti-hormonais com análogos ou antagonistas dos estrogênios (EBCTCG, 1992; ALLRED et al., 1998; DOWSETT et al., 2005).

O aumento da expressão da proteína p53, codificada pelo gene supressor tumoral *P53*, em células tumorais, constitui um fator de prognóstico desfavorável para pacientes com CM (CATTORETTI et al., 1988; BORRESEN-DALE, 2003; DICKSON, 2005). O aumento da expressão da proteína c-erb, codificada pelo oncogene *C-ERB*, é um outro fator de prognóstico desfavorável na doença (TOIKKEN et al., 1992; EISENBER & KOIFMAN, 2001; DICKSON, 2005).

3.3- Aspectos genéticos e moleculares

Embora 10-15% dos casos de CM tenham história familiar para a doença, apenas 5% deles podem ser explicados por mutações genéticas de alta penetrância nos oncogenes *BRCA-1* e *BRCA-2* (NEWMAN et al., 1988; PETO et al., 1996; BERTWISTLE, 1998; NELSON et al., 2005). Os oncogenes *C-MYC* e *C-ERB* (TOIKKEN et al., 1992; BUTT et al., 2005) e mutações e deleções do gene supressor tumoral *P53* (MARTINAZZI et al., 1993; BORRESEN-DALE, 2003; SUNPAWERAVONG & SUNPAWERAVONG, 2005) foram também relacionados com a cascata de eventos que precede o aparecimento do tumor, sua progressão local ou a ocorrência de metástases.

Ainda, alguns polimorfismos gênicos de baixa penetrância, como os envolvidos no metabolismo dos hormônios esteróides (*CYP17*, *CYP19*) e os codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT1*, *NAT2*) parecem influenciar o risco de ocorrência da doença, tanto em sua forma hereditária, quanto em sua forma esporádica (DUNNING et al., 1999; JONG et al., 2002; HONG et al., 2004; HOULSTON & PETO, 2004; YANG, et al., 2005).

4- Angiogênese em câncer de mama

A dependência do crescimento, invasão e disseminação de tumores sólidos na angiogênese, incluindo o CM (FOX et al., 2001; LEEK, 2001; GUNEL et al., 2002), tornou-se evidente na última década. Além da produção de citocinas pró-angiogênicas, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (FOX et al., 2001; IM et al., 2001; LANTZCH et al., 2002; ARAP et al., 2004), o CM parece estar associado à produção de proteínas endógenas anti-angiogênicas, como a endostatina (ES) (KUROI et al., 2001).

4.1- Endostatina

A ES é um fragmento terminal de 20kDa do colágeno XVIII, o produto do gene *COL18A1*, localizado no cromossomo 21 na região q22.3. Atua como inibidora da proliferação e migração de células endoteliais e indutora da apoptose destas células (O'REILLY et al., 1997; DHANABAL et al., 1999; DIXELIUS et al., 2000).

A proteína exerce estes efeitos por meio da sua interação com mediadores como a integrina $\alpha 5\beta 1$ (REHN et al., 2001; SUDHAKAR et al., 2003), o sulfato de heparina (SASAKI et al., 1999; BLACKHALL et al., 2003), a caveolina 1 (WICKSTRÖM et al., 2003) e a tropomiosina (MACDONALD et al., 2001).

Já são conhecidos os efeitos das proteínas quinase focal de adesão (FAK) e àquelas codificadas por genes da família Rho na regulação da sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais (REHN et al., 2001; SUDHAKAR et al., 2003). A ligação da ES com a integrina $\alpha 5\beta 1$ na membrana da célula endotelial induz a fosforilação da FAK, inibindo sua ação estimuladora na proliferação destas células. O complexo ES- $\alpha 5\beta 1$ interage com o sulfato de heparina (SASAKI et al., 1999; BLACKHALL et al., 2003) e com a caveolina 1 (WICKSTRÖM et al., 2003), inibindo a migração das células endoteliais. Além disso, a ES também pode interagir com a tropomiosina, com conseqüente rompimento de microfilamentos do citoesqueleto de células endoteliais, inibindo a mobilidade e induzindo a morte destas células por apoptose (MACDONALD et al., 2001). Assim, os moduladores da ES funcionam como inibidores da proliferação vascular.

Por outro lado, a ES compete com os fatores angiogênicos VEGF e o FGF-2 pelos mesmos receptores na superfície das células endoteliais, como o receptor KDR/Flk1 (VEGFR2). Caso vença a competição, será observada a inibição da angiogênese (KIM et al., 2002; CHANG et al., 1999; DIXELIUS et al., 2002).

A produção da ES, induzida de forma experimental em ratas com CM (SAUTER et al., 2000; DING et al., 2001; CALVO et al., 2002a) e em linhagens de células do CM humano (INDRACCOLO et al., 2002), determinou a diminuição do tamanho da neoplasia e inibiu o crescimento das células tumorais, respectivamente. A administração de ES exógena a ratas com CM também teve efeito anti-tumoral similar (YOKOYAMA et al., 2000; PERLETTI et al., 2000; CALVO et al., 2002b).

Concentrações endógenas aumentadas da ES foram observadas em pacientes com CM, ao diagnóstico, quando comparados a controles (KUROI et al., 2001; ZHAO et al., 2004), sugerindo que a proteína seria produzida como uma resposta do hospedeiro contra o tumor. Entretanto, não foram observadas reduções significativas das concentrações séricas da ES após a remoção do tumor, o que indica que o seu papel na doença não está determinado (ZHAO et al., 2004; TEH et al., 2004).

Por outro lado, a baixa incidência de tumores sólidos caracteriza pacientes com a síndrome de Down (HASLE et al., 2000), provavelmente devido às altas concentrações séricas da ES, produzidas pelas três cópias do gene *COL18A1* (ZORICK et al., 2001).

Assim, diferentes concentrações da proteína parecem estar associadas a susceptibilidades variáveis ao desenvolvimento ou progressão de tumores sólidos.

4.2- Polimorfismo D104N do gene *COL18A1*

Recentemente, foi descrito o polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, localizado na região codificadora da ES, no nucleotídeo 4349. Ele é caracterizado pela troca da base nitrogenada guanina por uma adenina com conseqüente substituição do aminoácido ácido aspártico pela asparagina (VISAKORPI et al., 1999).

Este polimorfismo foi descrito como associado ao aumento do risco de ocorrência do adenocarcinoma de próstata, o qual foi atribuído ao comprometimento da função da proteína (IUGHETTI et al., 2001). Entretanto, MACPHERSON et al. (2005), e LI et al. (2005), não encontraram nenhum tipo de associação desse polimorfismo gênico com a doença. Também não foram observadas associações do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* no risco de ocorrência de leucemias mielóide e linfóide (LIU et al., 2003), mieloma múltiplo (ORTEGA et al., 2003) e adenocarcinoma colorretal esporádico (NASCIMENTO et al., 2004).

A identificação de grupos de pacientes com alto risco para o CM, incluindo os caracterizados por fatores genéticos hereditários, tem importância para o diagnóstico precoce da doença por exames mais sensíveis e específicos, como a ultra-sonografia e a ressonância magnética da mama e para o tratamento profilático da doença com os análogos

do estrogênio, como o citrato de tamoxifeno e os inibidores da aromatase, como o letrozol e o anastrozol (FICHTNER et al., 2004; LONNING, 2004), ou ainda com inibidores do VEGFR, como o bevacizumabe, utilizado no momento apenas para o tratamento do CM metastático (FERSIS et al., 2004; RHEE & HOFF, 2005; JAIN et al., 2006).

Considerando que não há descrições sobre a influência do polimorfismo D104N na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico (CME), ou a sua associação com fatores clínicos, anátomo-patológicos e biológicos do tumor, foram definidos os objetivos do presente estudo.

OBJETIVOS

Foram avaliados um grupo de pacientes portadoras de CME e um grupo de doadores de sangue, que serviram como controles, tendo como objetivos:

- Verificar se o polimorfismo gênico influencia o risco de ocorrência do CME,
- Verificar se o polimorfismo gênico está associado aos aspectos clínicos das pacientes (idade, raça, idade da menarca, idade da menopausa, idade da primeira gestação, lactação, reposição hormonal e tabagismo) e anátomo-patológicos (tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear e estágio TNM) e biológicos (receptores hormonais de estrogênio e progesterona) do tumor,
- Verificar se o polimorfismo gênico está associado a diferentes concentrações da ES.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram avaliadas as pacientes com CME do tipo carcinoma atendidas, ao diagnóstico, no ambulatório de Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de 01 de agosto de 2003 a 31 de agosto de 2005.

Foram excluídas do estudo as pacientes que compareceram ao serviço com tumor ressecado e as que receberam tratamento prévio para a doença (cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico), devido a possível interferência na quantificação da ES sérica. Foram excluídas da análise as pacientes com tumor de outro tipo histológico que não carcinoma, as com recidiva da doença, as gestantes, os homens e aquelas que recusaram participar do estudo.

Foram também excluídas da análise as pacientes com possível câncer hereditário ou familiar. Foram consideradas como possíveis portadoras destes cânceres as pacientes que manifestaram a doença em idade menor do que 40 anos e aquelas com casos de CM ou ovário em familiares (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2005).

Cada paciente foi avaliada do ponto de vista clínico e laboratorial.

Foi também avaliado um grupo de controles, constituído por doadores de sangue atendidos no Hemocentro da UNICAMP, com o propósito de obter um grupo representativo dos indivíduos da região que procuram assistência médica em nosso serviço. Foram excluídos do grupo de controles, os indivíduos com antecedentes pessoal ou familiar de câncer.

O tamanho amostral do estudo, 500 pacientes e 500 controles, foi estabelecido de acordo com critérios descritos por BEIGUELMAN (1994).

1- Avaliação clínica

Os dados relativos à identificação, à idade, à raça, à idade da menarca, à idade da menopausa, à idade da primeira gestação, à lactação, à terapia de reposição hormonal e do tabagismo, foram coletados por meio de questionários específicos.

Foram consideradas mulheres que amamentaram as pacientes que o fizeram por período maior do que seis meses. Foram consideradas mulheres que não amamentaram aquelas que literalmente não o fizeram ou que o fizeram por período menor do que seis meses (CLEMONS & GOSS, 2001).

Foram consideradas pacientes que receberam terapêutica hormonal, aquelas tratadas com hormônios por um período maior que cinco anos (BARROS et al., 2001).

Foram consideradas tabagistas as pacientes que fumaram até o momento do diagnóstico da doença ou que pararam de fumar há menos de dez anos e não tabagistas aquelas que nunca fumaram ou pararam de fumar há mais de dez anos.

As pacientes foram distribuídas de acordo com a idade, a raça, a idade da menarca, a idade da menopausa, a idade da primeira gestação, o antecedente de lactação, o antecedente de terapêutica hormonal e o hábito de fumar.

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, à raça e aos antecedentes pessoal e familiar de câncer foram obtidos por interrogatório específico em controles. Estes foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo e a raça.

2- Avaliação do tumor

2.1- Tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear e estágio

O diagnóstico do CME foi realizado em fragmentos de tecido mamário, obtidos por meio de biópsias percutânea ou incisional. Os cortes histológicos foram obtidos por meio da inclusão dos fragmentos em parafina e a seguir, corados pela hematoxilina e eosina. Foram processados e analisados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

O tipo histológico do tumor foi determinado de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1981). Os graus de diferenciação e nuclear do tumor foram identificados com a utilização dos

critérios estabelecidos por SCARFF BLOOM RICHARDSON, em 1957 (BLOOM & RICHARDSON, 1957). Os graus I, II e III foram utilizados para caracterizar o tumor como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado, respectivamente. Os graus 1, 2 e 3 foram utilizados também para caracterizar os núcleos do tumor como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciado ou pouco diferenciado, respectivamente (ELSTON & ELLIS, 1998).

O estágio do tumor, TNM, foi obtido com base nos achados do exame histológico da peça cirúrgica e nos resultados obtidos da radiografia do tórax, da ultrassonografia abdominal e pélvica e da cintilografia óssea, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SINGLETERY et al., 2002) (Tabelas 1 e 2).

Foram responsáveis pela obtenção das informações clínicas das pacientes e anátomo-patológicas do tumor, o Dr. Cassio Cardoso Filho do CAISM da UNICAMP e a Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel, do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A bióloga Maria Teresa Teori, do Hemocentro da UNICAMP, obteve as informações clínicas dos controles.

Tabela 1- Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer de mama

Categorias	Descrições
Categoria T	Tumor
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ
Tis (CLIS)	Carcinoma lobular in situ
	Doença de Paget do mamilo sem nenhum tumor
Tis (Paget)	Nota: A doença de Paget associada a tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor
T1	Tumor menor que 2 cm na sua maior dimensão
T1mic	Microinvasão menor que 0,1 cm na sua maior dimensão
T1a	Tumor maior que 0,1 cm e menor que 0,5 cm na sua maior dimensão
T1b	Tumor maior que 0,5 cm e menor que 1 cm na sua maior dimensão
T1c	Tumor maior que 1 cm e menor que 2 cm na sua maior dimensão
T2	Tumor maior que 2 cm e menor que 5 cm na sua maior dimensão
T3	Tumor maior que 5 cm na sua maior dimensão
T4	Tumor com qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele
T4a	Extensão para a parede torácica, não incluindo músculos peitorais
T4b	Edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites, restritos à mesma mama
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
Categoria N	Linfonodos regionais
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (previamente removidos)
N0	Nenhuma metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) auxiliar(s) móvel(is) ipsilateral(is)
	Metástase em linfonodos axilares fixos ou conglomerados, ou *detectados clinicamente
N2	na mama interna ipsilateral e ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo axilar
N2a	Metástase em linfonodos axilares ipsilaterais conglomerados ou fixos a outras estruturas
N2b	Metástase *detectada clinicamente somente em linfonodos da mama interna ipsilateral e na ausência de evidências clínicas de metástase em linfonodo axilar

N3	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular ipsilateral, ou *detectado(s) clinicamente em linfonodo(s) da cadeia mamária interna ipsilateral e na presença de evidências clínicas de metástase em linfonodos axilares; ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento de linfonodo axilar ou da mamária interna
N3a	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular e linfonodo(s) axilar
N3b	Metástase em linfonodo(s) ipsilateral de mamária interna e linfonodo(s) axilar
N3c	Metástase em linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral
Categoria pN**	Linfonodos regionais
pNX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (previamente removidos ou não removidos para exame anátomo patológico)
pN0	Nenhuma metástase histológica em linfonodos regionais, nenhum exame adicional para isolar células tumorais***
pN0 (i -)	Nenhuma metástase histológica em linfonodos regionais, imunohistoquímica negativa
pN0 (i +)	Nenhuma metástase histológica em linfonodos regionais, imunohistoquímica positiva, nenhum foco imunohistoquímico maior que 0,2 mm
pN0 (mol -)	Nenhuma metástase histológica em linfonodos regionais, achados moleculares negativos (RT-PCR)
pN0 (mol +)	Nenhuma metástase histológica em linfonodos regionais, achados moleculares positivos (RT-PCR)
pN1mi	Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm)
pN1	Metástase em um a três linfonodos auxiliares e/ou linfonodos em mamária interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não detectados clinicamente****
pN1a	Metástase em um a três linfonodos axilares
pN1b	Metástase em linfonodos da mamária interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não detectado clinicamente
pN1c	Metástase em um a três linfonodos auxiliares e em linfonodos da mamária interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não detectado clinicamente
pN2	Metástase em quatro a nove linfonodos axilares, ou linfonodos da mamária interna detectados na ausência de metástase e linfonodo axilar
pN2a	Metástase em quatro a nove linfonodos (maior que 2 mm)
pN2b	Metástase em linfonodos da mamária interna *detectado clinicamente na ausência de metástase em linfonodo axilar

pN3	Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares, ou em linfonodos infraclaviculares, ou em linfonodos ipsilaterais da mama interna *detectados clinicamente na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de três linfonodos axilares com metástases microscópicas clinicamente negativas em mama interna; ou em linfonodos ipsilaterais supraclaviculares
pN3a	Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (maior que 2,0 mm), ou metástase para linfonodos infraclaviculares
pN3b	Metástase em linfonodos de mama interna *detectado clinicamente na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos, ou em mais do que três linfonodos axilares e em linfonodos de mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela, mas não detectado clinicamente
pN3c	Metástase em linfonodos ipsilaterais supraclaviculares
Categoria M	Metástase à distância
MX	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Nenhuma metástase à distância
M1	Metástase à distância

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa. *Detectado clinicamente é definido como detectável por meio de estudos de imagens (excluindo linfocintilografia) ou por exame clínico. **A classificação é baseada na dissecação de linfonodo axilar com ou sem a dissecação de linfonodo sentinela. A classificação é baseada na dissecação do linfonodo sentinela sem dissecação subsequente axilar é designada (sn) por nódulo sentinela (pN0 (i +) (sn)). ***Células tumorais isoladas são definidas como simples células tumorais ou pequenos focos menores ou iguais a 0,2 mm, usualmente detectados somente por imunohistoquímica ou métodos moleculares mas os quais podem ser verificados na coloração de hematoxilina eosina. Células tumorais isoladas não mostram usualmente evidências de atividade metastática (proliferação ou reação estromal). ****Não detectável clinicamente é definido como não detectável por estudos de imagem (excluindo linfocintilografia) ou por exame clínico. Se associado com mais de três linfonodos axilares positivos, os linfonodos da mama interna são classificados como pN3b para refletir crescimento tumoral

Tabela 2- Grupos de estágios e características TNM do câncer de mama

Estágio		Classificação TNM	
0	Tis	N0	M0
I	T1*	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	qualquer T	N3	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M0

*T1 inclui T1mic

As pacientes foram distribuídas de acordo com o tipo histológico, os graus de diferenciação e nuclear e o estágio TNM do tumor.

2.2- Receptores hormonais

A avaliação dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona em células do CM foi realizada em cortes histológicos de fragmentos do tumor das pacientes inseridas no estudo, por método imuno-histoquímico, com a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981). Para tal procedimento foram utilizados os anticorpos monoclonais *Estrogen Receptor-clone 6F11* e *Progesterone Receptor-clone 6F16* (NovocastraTM, UK).

Os procedimentos técnicos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM da UNICAMP, sob a coordenação da Dra. Glauce Aparecida Pinto.

2.2.1- Preparação dos cortes histológicos

Inicialmente foi realizada a silanização de lâminas de vidro para a retirada de gordura. Para tal, elas foram lavadas em água corrente e permaneceram em álcool absoluto durante toda a noite. A seguir, foram colocadas em acetona pura durante um minuto, em acetona com silano durante três minutos, em acetona pura durante um minuto e, a seguir, em estufa a 110°C para secagem.

Os cortes histológicos foram obtidos de tecido tumoral incluídos em parafina com a utilização de um micrótomo (Leica, Werzlar, Hessen, Alemanha). A seguir, foram transferidos para um banho-maria a 60°C para estiramento dos cortes de parafina, e foram colocados em lâminas de vidro limpas.

2.2.2- Reação de imunoperoxidase e coloração

As lâminas com os fragmentos tumorais incluídos em parafina foram colocadas em xilol aquecido em estufa a 110°C durante 15 segundos para a retirada da parafina. A seguir, o material foi submetido à lavagem durante 15 segundos em xilol, à temperatura ambiente (TA), à hidratação em álcool 80% e álcool 50% durante 15 segundos cada e à lavagem em água corrente durante cinco minutos.

Posteriormente, o material foi submetido a três lavagens em água oxigenada 10% durante três minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A seguir, foi realizada a recuperação antigênica endógena. Tal procedimento visou romper as possíveis ligações entre os grupos aminos dos aminoácidos de proteínas do tecido mamário, com a conseqüente formação de pontes de metileno, por ação do formol utilizado para a fixação do material. Estas pontes poderiam bloquear o acesso dos anticorpos aos respectivos antígenos do tumor, mascarando-os. Para tal, as lâminas com o material fixado foram incubadas em uma panela a vapor a 95°C, com tampão de citrato 10mM pH 6,0, durante 30 minutos. A seguir, foram resfriadas à TA durante 20 minutos, lavadas em água corrente durante cinco minutos, e colocadas em uma solução tampão salina fosfato (PBS), onde permaneceram até o início dos procedimentos inerentes às reações imunohistoquímicas.

Para a realização das reações imunohistoquímicas, o material recebeu 100µl de cada anticorpo primário específico e foi incubado em câmara úmida com água a 37°C durante 30 minutos. Permaneceu em geladeira a 4°C durante toda a noite.

No dia seguinte, as lâminas com o material fixado foram retiradas da geladeira e foram submetidas a três lavagens em tampão PBS à TA durante cinco minutos. A seguir, receberam o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase “EnVision” (DAKO; Glostrup, Dinamarca) a 37°C durante uma hora. Após a secagem das mesmas, foram coradas com diaminobenzidina 3,3-diaminobenzidina-tetrahidroclorato (DAB) (Sigma; Steinheim, Alemanha) a 37°C durante cinco minutos. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. A seguir, foram desidratadas em álcool e xilol e após esses procedimentos, receberam uma laminula que foi fixada ao corte histológico com bálsamo do Canadá. Foram considerados como tendo receptores hormonais (estrogênio ou progesterona) positivos os tumores com expressão identificada em pelo menos 10% das células para cada receptor.

As pacientes foram distribuídas de acordo com o padrão de receptores hormonais do tumor.

3- Análise molecular do gene *COL18A1*

3.1- Identificação do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*

3.1.1- Extração de DNA a partir de leucócitos

O método utilizado para a extração do DNA foi o descrito por WOODHEAD et al. (1986), com modificações. De forma sucinta, foram colhidos 4ml de sangue periférico de cada paciente e controle, em frasco estéril com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A amostra foi centrifugada a 1300 rpm por dez minutos. Após o descarte do plasma, 500µl dos eritrócitos foram lisados em um tubo cônico de 1,5ml com uma mistura de sacarose 320mM, Tris HCl 10mM pH 7,5, MgCl₂ 5mM e Triton X-100 1%. A seguir, o botão de células obtido foi ressuspenso em uma mistura de Tris HCl pH 7,5, EDTA 10mM, NaCl 10mM e dodecil sulfato sódio (SDS) 20%, compondo um tampão de digestão de proteínas, juntamente com a proteinase K 20mg/ml e

levado ao banho-maria a 55°C por duas horas. Em seguida, foram adicionados 200µl de cloreto de lítio e levado ao freezer a -20°C durante 15 minutos. Após, foi retirado do freezer e centrifugado por dez minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de 1,5ml. A seguir, o DNA foi precipitado em etanol absoluto, re-hidratado em álcool 70% e diluído em água estéril a 37°C.

3.1.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os procedimentos técnicos para a amplificação de parte do éxon 42 do gene *COL18A1*, estão descritos abaixo.

Em tubo cônico de 0,6ml foi adicionado 2,5µl do DNA a ser estudado, tampão da enzima (50mM de cloreto de potássio e 10mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5mM de cloreto de magnésio, 0,1mM de iniciadores descritos por IUGHETTI et al. (2001): sense (5'-CACGGTTTCTCTTCCAGGAC-3') e antisense (5'-CTCTCAGAGCTGCTCACAG-3'), 200mM da mistura desoxirribonucleica – dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e 2,0U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL), em um volume final de 55µl.

A reação foi conduzida inicialmente, por um ciclo a 94°C durante cinco minutos, para inativação da atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática e posteriormente, por 32 ciclos de amplificação em termociclador (MJ Research Inc, Waltham, Massachusetts, US). Cada ciclo foi realizado sob as seguintes condições: 94°C durante 40 segundos (para desnaturação do DNA); 61°C durante 40 segundos (para ocorrer a ligação complementar entre os iniciadores e o DNA) e 72°C durante um minuto (para a síntese do DNA, com a enzima *Taq* DNA polimerase). Ao término dos 32 ciclos, o produto de amplificação foi mantido a 72°C durante sete minutos (período final da síntese de DNA), completando um único ciclo. A seguir, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Após as reações de amplificação, 8µl do produto da PCR foram submetidos à corrida eletroforética, em cuba de eletroforese horizontal, em gel de agarose 3% com brometo de etídeo, para a visualização do fragmento amplificado sob luz ultravioleta. Foram utilizados como controle positivo e negativo, amostras de DNA obtidas a partir de sangue periférico de um indivíduo com homozigose dos alelos selvagens e água,

respectivamente. Um fragmento de DNA com 169 pares de bases foi observado em amostras com integridade do DNA. Foram consideradas amostras com DNA degradado ou obtidas em escassas quantidades, aquelas nas quais não foi observado o fragmento de 169 pares de bases.

3.1.3- Digestão enzimática

O polimorfismo D104N do gene *COL18A1* foi avaliado por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados, com a utilização de uma mistura de 10µl do produto da PCR, 3,0µl de água estéril, 1,5µl de tampão e 0,5µl da enzima *MseI* (Invitrogen). A seguir, a mistura foi colocada em banho-maria, a 37°C durante toda a noite. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 3% com brometo de etídeo, para a visualização do fragmento amplificado sob luz ultravioleta.

Fragmentos de 169 pares de bases foram obtidos dos alelos selvagens (DD). Já os alelos NN foram caracterizados por fragmentos de 101 e 68 pares de bases.

As frequências dos genótipos D104N do gene *COL18A1* foram avaliadas em pacientes e controles, assim como em pacientes estratificadas de acordo com as características clínicas (idade, raça, idades da menarca, menopausa e primeira gestação, lactação, terapia de reposição hormonal e hábito do tabagismo) e anátomo-patológicos e biológicos do tumor (tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear, estágio TNM e padrão dos receptores hormonais) e em controles estratificados de acordo com idade, sexo e raça.

4- Quantificação da ES sérica

A quantificação da ES sérica em pacientes ao diagnóstico e controles foi realizada em amostras de soro congelado a -20°C por meio do método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), no Laboratório de Sorologia do Hemocentro da UNICAMP, sob a coordenação da Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves. Para tal determinação foi utilizado o kit comercial *Human EndostatinTM Protein Accucyte® EIA Cat# QIA65*. Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (Oncogene Research Products, San Diego, Califórnia, US).

4.1- Preparação dos padrões da ES

Foram adicionados 1000µl do diluente # 1 à ES padrão (liofilizada), cuja concentração é de 500ng/ml. Foram numerados seis tubos para a realização da série dos padrões com as concentrações de 500,00; 125,00; 31,25; 7,81; 1,95 e 0,00ng/ml. A seguir, foram adicionados 600µl do diluente # 1 a cada tubo, exceto ao primeiro tubo, onde foram adicionados 800µl da solução da ES padrão com concentração de 500,00ng/ml. Foram removidos 200µl da solução do primeiro tubo e foram adicionados ao segundo tubo para preparação da solução padrão com concentração de 125,00ng/ml. Foram removidos 200µl da solução do segundo tubo e foram adicionados ao terceiro tubo para a preparação da solução com concentração de 31,25ng/ml. A repetição desse procedimento foi realizada até a obtenção de toda a série dos padrões.

4.2- Quantificação da ES por ELISA

Todas as amostras (soro de pacientes e controles) e a série de padrões foram diluídas na proporção de um para quatro (1:4). A quantificação da ES em amostras de pacientes e controles e da série de padrões foi realizada em duplicata.

Foram distribuídos 100µl de cada padrão e amostras das pacientes e dos controles nos 96 poços da placa ELISA revestidos com anticorpos de coelhos anti-cabras. A seguir, foram adicionados a cada poço da placa ELISA 25µl de ES conjugada (anticorpos de camundongos ligados à biotina) e 25µl de anticorpos para a ES (anticorpos de camundongos). A mistura foi incubada a TA durante três horas. A seguir, foram adicionados em cada poço da placa ELISA 250µl de tampão para lavagem com a utilização de um lavador automático (Washer 430, UK), realizando dois ciclos com cinco lavagens cada, durante dez minutos. Foram adicionados a cada poço da placa ELISA 50µl de estreptavidina (proteína que se liga à biotina) conjugada com a enzima fosfatase alcalina durante 30 minutos à TA. A seguir, foram adicionados a cada poço da placa ELISA 250µl de tampão para lavagem com a utilização do lavador automático, realizando dois ciclos com cinco lavagens cada, durante dez minutos. Foram adicionados a cada poço da placa ELISA 200µl do reagente de coloração (substrato para a enzima) durante 20 minutos à TA.

As absorvâncias obtidas de uma série de seis padrões que possuem suas concentrações já conhecidas (500,00; 125,00; 31,25; 7,81; 1,95 e 0ng/ml), foram medidas em um espectrofotômetro (Sunrise, TECAN, Mannedorf, Zurich, Suíça), em duplicata, na faixa de densidade óptica (DO) de 492nm. As médias de duas medidas de absorvâncias para cada concentração, foram utilizadas para a realização do gráfico padrão, com o programa *Microcal Origin 4.10* (Microcal Software Inc., Northampton, Massachusetts, US). Para cada *kit* de ES utilizado, o procedimento foi repetido. A seguir, foram medidas as absorvâncias de amostras de pacientes e de controles. As absorvâncias obtidas, foram transformadas em concentrações da ES, pelo programa *Microcal Origin 4.10* (Microcal Software Inc., Northampton, Massachusetts, US), tendo como base de comparação os valores dos gráficos padrão.

As pacientes e os controles foram distribuídos de acordo com as concentrações de ES sérica. As pacientes e os controles estratificados por genótipos do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* foram também distribuídos de acordo com as concentrações de ES sérica.

5- Aspectos éticos

O estudo molecular e a quantificação da ES foram realizados em amostras de sangue periférico obtidas por ocasião da punção venosa realizada para a coleta de exames necessários ao pré-operatório ou estadiamento do tumor em pacientes e da doação de sangue em controles.

A radiografia de tórax, a ultrassonografia de abdome e pelve, a cintilografia óssea foram realizadas como exames de rotina para o estadiamento do CME. Nenhum material adicional foi colhido de pacientes ou controles.

Os procedimentos foram realizados após a obtenção das cartas de consentimento pós-informação assinadas por pacientes (Anexo 1) e controles (Anexo 2) que aceitaram participar do estudo proposto.

O presente estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (registro nº 581/2002) e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (registro nº 7239).

6- Análise estatística

O teste de verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com o intuito de verificar se ocorre distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo (BEIGUELMAN, 1995).

O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado. As comparações dos valores da ES sérica entre grupos foram calculadas por meio do teste de Mann Whitney. Valores de P menores do que 0,05 foram considerados significantes.

As determinações dos riscos de ocorrência do CME, a que as pacientes e controles foram ou estão submetidos, foram obtidas por meio das razões das chances (ORs) e calculadas considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Os valores das ORs foram corrigidos por meio de modelos de regressão logística multivariada, tendo como variável dependente o grupo (pacientes e controles) e como variáveis independentes a idade, a raça e os genótipos do gene *COL18A1*.

As análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico *SAS System for Windows* (Statistical Analysis System; Cary, North Carolina, US), versão 8.1 (FLEIS, 1981; AGRESTI & FINLAY, 1986).

RESULTADOS

1- Avaliação clínica

As distribuições individualizadas das 181 pacientes, de acordo com a idade, a raça, a idade da menarca, a idade da menopausa, a idade da primeira gestação, a lactação, a terapia de reposição hormonal e o hábito do tabagismo estão apresentadas no Anexo 3.

As distribuições das 181 pacientes com CME incluídas no estudo, de acordo com as características clínicas, estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com a idade, a raça, a idade da menarca, a idade da menopausa e a idade da primeira gestação

Variáveis	Número de pacientes (%)
Idade (anos)	
< 57	89 (49,2)
≥ 57	92 (50,8)
Raça	
Caucasóide	139 (76,8)
Negróide	42 (23,2)
Menarca (anos)	
≤ 12	73 (40,3)
> 12	103 (56,9)
Não obtida	5 (2,8)
Menopausa (anos)	
< 50	57 (31,5)
≥ 50	55 (30,4)
Histerectomizada	6 (3,3)
Ainda menstrua	57 (31,5)
Não obtida	6 (3,3)
Idade primeira gestação (anos)	
< 30	133 (73,5)
≥ 30	18 (10,0)
Nunca engravidou	20 (11,0)
Não obtida	10 (5,5)

A idade média $\pm$ DP das pacientes inseridas no estudo foi de 57,0 anos $\pm$ 14,0 anos, com mediana de 57,0 anos (variação: 40 - 90 anos). Cerca de metade da casuística foi constituída por pacientes com idade menor do que 57 anos.

A distribuição das pacientes por raça mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides.

As distribuições das pacientes por idade à menarca e idade à menopausa mostraram que cerca de 57% das pacientes tiveram a primeira menstruação depois dos 12 anos e que cerca de 30% das pacientes entraram na menopausa antes dos 50 anos de idade.

A maioria das pacientes engravidou pela primeira vez antes dos 30 anos.

Tabela 4- Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com a lactação, a terapia de reposição hormonal e o hábito do tabagismo

Variáveis	Número de pacientes (%)
Lactação	
Sim	110 (60,8)
Não	64 (35,3)
Não obtida	7 (3,9)
Terapia de reposição hormonal	
Sim	11 (6,1)
Não	166 (91,7)
Não obtida	4 (2,2)
Hábito de fumar	
Tabagista	43 (23,8)
Não tabagista	134 (74,0)
Não obtida	4 (2,2)

Observamos que cerca de 60% das pacientes amamentaram por mais de seis meses, que a maioria das pacientes não fez nenhum tipo de terapia de reposição hormonal. Ainda, a maioria das pacientes não tinha o hábito de fumar.

As distribuições individualizadas dos 448 controles, de acordo com a idade, o sexo e a raça estão apresentadas no Anexo 4.

A idade média $\pm$ DP dos controles inseridos no estudo foi de 51,0 anos $\pm$ 6,0 anos, com mediana de 52,0 anos (variação: 25 - 62 anos).

Dos 448 controles, 250 indivíduos foram do sexo feminino e 198 do sexo masculino; 384 caucasoídes e 64 negróides.

2- Avaliação do tumor

2.1-Tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear e estágio

As distribuições individualizadas das 181 pacientes de acordo com o tipo histológico, o grau de diferenciação, o grau nuclear e o estágio do tumor estão apresentadas no Anexo 5.

As distribuições das 181 pacientes com CME incluídas no estudo, de acordo com as características do tumor, estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico de acordo com o tipo histológico, o grau de diferenciação, o grau nuclear e o estágio TNM do tumor

Variáveis do tumor	Número de pacientes (%)
Tipo histológico do carcinoma	
Ductal invasivo	161 (88,9)
Colóide	5 (2,8)
Lobular invasivo	4 (2,1)
Apócrino	3 (1,6)
Ductal in situ	2 (1,1)
Tubular	2 (1,1)
Ductal + Colóide	2 (1,1)
Ductal + Apócrino	1 (0,6)
Neuroendócrino	1 (0,6)
Grau de diferenciação	
I	3 (1,7)
II	23 (12,7)
III	141 (77,9)
Não avaliado	14 (7,7)
Grau nuclear	
1	1 (0,6)
2I	77 (42,5)
3	91 (50,3)
Não avaliado	12 (6,6)
Estágio TNM	
I	27 (15,0)
II	86 (47,5)
III	58 (32,0)
IV	8 (4,4)
Não avaliado	2 (1,1)

As distribuições das pacientes por tipo histológico, grau de diferenciação e grau nuclear do tumor mostraram que a maioria apresentou carcinoma ductal invasivo, cerca de 80% delas apresentaram tumor de grau indiferenciado e metade do número delas apresentou tumor de grau nuclear 3.

Já a distribuição por estágios do sistema TNM mostrou que cerca de 40% das pacientes apresentaram tumor de estágio avançado (estágios III + IV). O estadiamento do tumor não foi realizado em duas pacientes devido à falta de dados relativos à extensão e ao acometimento de linfonodos ou órgãos a ele adjacentes ou distantes.

2.2- Receptores hormonais

A avaliação dos receptores hormonais foi realizada em 148 das 181 pacientes.

As distribuições individualizadas das 148 pacientes com CME inseridas no estudo, de acordo com os padrões de receptores hormonais estão apresentadas no Anexo 5.

Foram observadas 104 pacientes (70,3%) com receptores positivos para o estrogênio e 44 pacientes (29,7%) com receptores negativos para o hormônio. Noventa e seis pacientes (64,9%) apresentaram tumor com receptores positivos para a progesterona e 52 pacientes (35,1%) com receptores negativos para o hormônio.

3- Análise molecular do gene *COL18A1*

3.1- Polimorfismo D104N em pacientes e controles

As distribuições individualizadas das pacientes com CME e controles, de acordo com os genótipos do gene *COL18A1*, estão apresentadas nos Anexos 6 e 4, respectivamente.

Os resultados obtidos em indivíduos inseridos no estudo, com a amplificação de parte do éxon 42 do gene *COL18A1* por PCR e após a digestão enzimática dos fragmentos obtidos por PCR, estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

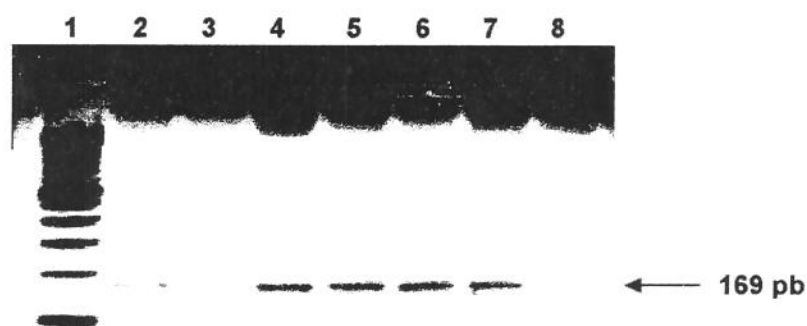


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose 3% com fragmentos de 169 pb obtidos após a amplificação de parte do éxon 42 do gene *COL18A1* por meio da reação em cadeia da polimerase. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100pb, está apresentado na coluna 1. Os resultados obtidos de indivíduos inseridos no estudo estão apresentados nas colunas de 2 a 8

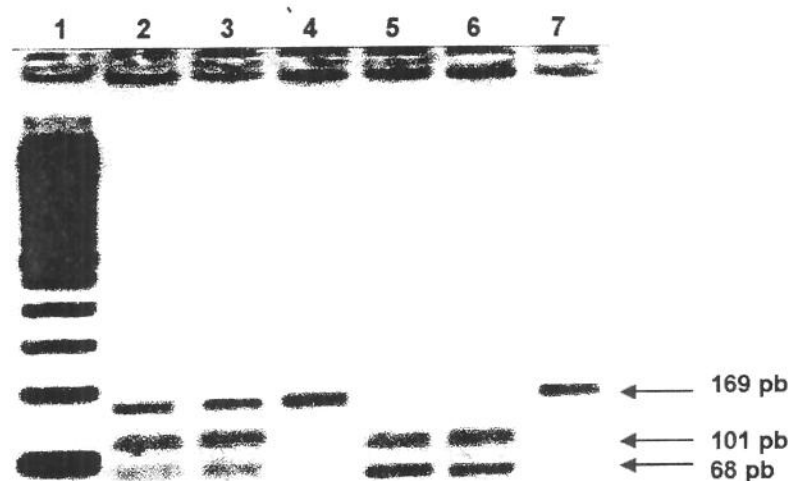


Figura 2- Produtos da digestão enzimática com a enzima *MseI* para a identificação do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, em gel de agarose 3%. Os fragmentos de 169 pb correspondem ao alelo selvagem (D) e os fragmentos de 101pb e 68 pb correspondem ao alelo polimórfico (N). O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está apresentado na coluna 1. Os resultados obtidos de indivíduos com o genótipo selvagem estão apresentados nas colunas 4 e 7. Os resultados obtidos em indivíduos com o genótipo DN estão apresentados nas colunas 2 e 3 e com o genótipo NN nas colunas 5 e 6

As amostras dos controles avaliadas para o polimorfismo D104N estiveram no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 2,15$, $P = 0,14$). Em contraste, as amostras das pacientes não confirmaram a expectativa de Hardy-Weinberg no locus D104N do gene *COL18A1* ($X^2 = 22,87$; $P < 0,0001$), indicando uma frequência alélica diferente da encontrada em controles.

As frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes com câncer de mama esporádico e em controles

Polimorfismo	Pacientes	Controles	OR (IC 95%)	Valor de P
D104N	n (%)	n (%)		
NN	5 (2,8)	0 (0,0)		0,003
DN	15 (8,3)	58 (12,9)		
DD	161 (88,9)	390 (87,1)	1,0 (referência)	
NN + DN	20 (11,1)	58 (12,9)	0,84 (0,49-1,43)	0,603
DD	161 (88,9)	390 (87,1)	1,0 (referência)	
NN	5 (2,8)	0 (0,0)	Infinito	0,002
DN + DD	176 (97,2)	448 (100,0)	1,0 (referência)	

n= número de casos; NN= indivíduos com o polimorfismo em homozigose; DN= indivíduos com o polimorfismo em heterozigose; DD= indivíduos com os alelos selvagens; OR= razão das chances; IC= intervalo de confiança

Observamos que a frequência do genótipo NN foi maior em pacientes do que em controles, quando os grupos foram avaliados separadamente. Vale notar que o genótipo NN esteve presente apenas em pacientes.

Não foram observadas diferenças na frequência do genótipo combinado NN mais DN e do genótipo selvagem em pacientes e controles. Riscos similares de ocorrência da doença foram observados em indivíduos com os distintos genótipos. Em contraste, a frequência do genótipo NN foi significativamente maior em pacientes do que a frequência dos demais genótipos agrupados. Indivíduos com o genótipo NN estiveram sob risco infinitamente maior de ocorrência da doença do que indivíduos com os demais genótipos agrupados.

3.2- Polimorfismo D104N e aspectos clínicos

As frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes estratificados por aspectos clínicos estão apresentadas na Tabela 7.

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos D104N do gene *COL18A1* em pacientes com CME, em relação à idade, à raça, à idade da menarca, à idade da menopausa, à idade da primeira gestação, à lactação, à terapia de reposição hormonal e ao hábito de fumar.

3.3- Polimorfismo D104N aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor

As frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 7- Frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes estratificados por aspectos clínicos

	N	Polimorfismo D104N		P valor
		DD + DN (%)	NN (%)	
Idade (anos)	181			
< 57	89	86 (47,5)	3 (1,7)	0,68
≥ 57	92	90 (49,7)	2 (1,1)	
Raça	181			
Caucasóide	139	135 (74,6)	4 (2,2)	1,00
Negróide	42	41 (22,7)	1 (0,5)	
Menarca (anos)	176			
≤ 12	73	70 (39,8)	3 (1,7)	0,65
> 12	103	101 (57,4)	2 (1,1)	
Menopausa (anos)	112			
< 50	57	55 (49,1)	2 (1,8)	1,00
≥ 50	55	54 (48,2)	1 (0,9)	
Primeira gestação (anos)	151			
< 30	133	128 (84,8)	5 (3,3)	1,00
≥ 30	18	18 (11,9)	0 (0,0)	
Lactação	174			
Sim	110	106 (60,9)	4 (2,3)	0,65
Não	64	63 (36,2)	1 (0,6)	
TRH	177			
Sim	11	11 (6,2)	0 (0,0)	1,00
Não	166	161 (91,0)	5 (2,8)	
Tabagismo	177			
Sim	43	42 (23,7)	1 (0,6)	1,00
Não	134	130 (73,4)	4 (2,3)	

N= número de casos; DD= indivíduos com o genótipo selvagem; DN= indivíduos com o polimorfismo em heterozigose; NN= indivíduos com o polimorfismo em homozigose; Lactação: Sim= amamentou por mais de seis meses, N= não amamentou ou amamentou por menos de seis meses; TRH= terapia de reposição hormonal

Tabela 8- Frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor

	N	Polimorfismo D104N		P valor
		DD + DN (%)	NN (%)	
Tipo histológico	181			
CDI	161	157 (86,7)	4 (2,2)	0,45
Outros	20	19 (10,5)	1 (0,6)	
Grau de diferenciação	167			
I + II	26	24 (14,4)	2 (1,2)	0,11
III	141	139 (83,2)	2 (1,2)	
Grau nuclear	169			
1 + 2	78	77 (45,6)	1 (0,6)	0,63
3	91	88 (52,0)	3 (1,8)	
Estágio TNM	179			
I + II	114	111 (62,0)	3 (1,7)	1,00
III + IV	65	63 (35,2)	2 (1,1)	
Receptor estrogênio	148			
Positivo	104	100 (67,6)	4 (2,7)	1,00
Negativo	44	43 (29,0)	1 (0,7)	
Receptor progesterona	148			
Positivo	96	92 (62,2)	4 (2,7)	0,66
Negativo	52	51 (34,4)	1 (0,7)	

N= número de casos; DD= indivíduos com genótipo selvagem; DN= indivíduos com o polimorfismo em heterozigose; NN= indivíduos com o polimorfismo em homozigose; Tipo histológico, CDI= carcinoma ductal invasivo; Outros= colóide, lobular, apócrino, ductal “in situ”, tubular, ductal+colóide, ductal+apócrino e neuroendócrino

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos D104N do gene *COL18A1* em pacientes com CME, em relação ao tipo histológico, ao grau de diferenciação, ao grau nuclear, ao estágio TNM, aos receptores de estrogênio e progesterona.

O grau de diferenciação e o grau nuclear do tumor não puderam ser avaliados em uma única paciente com o genótipo NN e com o carcinoma do tipo lobular.

4- Quantificação da ES sérica

A ES sérica foi quantificada em 118 pacientes com CME e 158 controles. As distribuições individualizadas das pacientes e dos controles, de acordo com as concentrações da ES sérica, estão apresentadas nos Anexos 6 e 4, respectivamente.

As concentrações e as absorbâncias, obtidas da série de seis padrões, bem como a média das medidas realizadas em quatro testes, estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9- Distribuições das concentrações dos seis padrões da endostatina de quatro *kits* e suas respectivas absorbâncias e médias, utilizadas para a realização dos gráficos padrão, por meio do método ELISA

Concentração (ng/ml)	Absorbância 1 (DO=492nm)	Absorbância 2 (DO=492nm)	Média (DO=492nm)
Primeiro kit			
500	0,144	0,139	0,1365
125	0,306	0,268	0,287
31,3	0,635	0,577	0,606
7,8	0,916	0,893	0,9045
2	1,301	1,293	1,297
0,1	1,493	1,886	1,6895
Segundo kit			
500	0,213	0,197	0,205
125	0,512	0,460	0,486
31,3	1,086	1,112	1,099
7,8	1,981	1,863	1,922
2	2,429	2,345	2,387
0,1	2,156	2,258	2,207
Terceiro kit			
500	0,202	0,238	0,220
125	0,461	0,450	0,455
31,3	0,984	1,042	1,013
7,8	1,742	1,748	1,745
2	2,043	1,984	2,013
0,1	2,149	2,133	2,141
Quarto kit			
500	0,161	0,171	0,166
125	0,172	0,181	0,176
31,3	0,224	0,199	0,211
7,8	0,254	0,239	0,246
2	0,286	0,271	0,278
0,1	0,284	0,400	0,342

Absorbância 1= primeira leitura dos padrões; Absorbância 2= segunda leitura dos padrões;
Média= média das absorbâncias 1 e 2; DO= densidade óptica

As curvas dos padrões obtidas para cada um dos quatro *kits* de ES utilizados nos quatros experimentos realizados para tal determinação em pacientes e controles estão apresentadas nas Figuras 3 a 6.

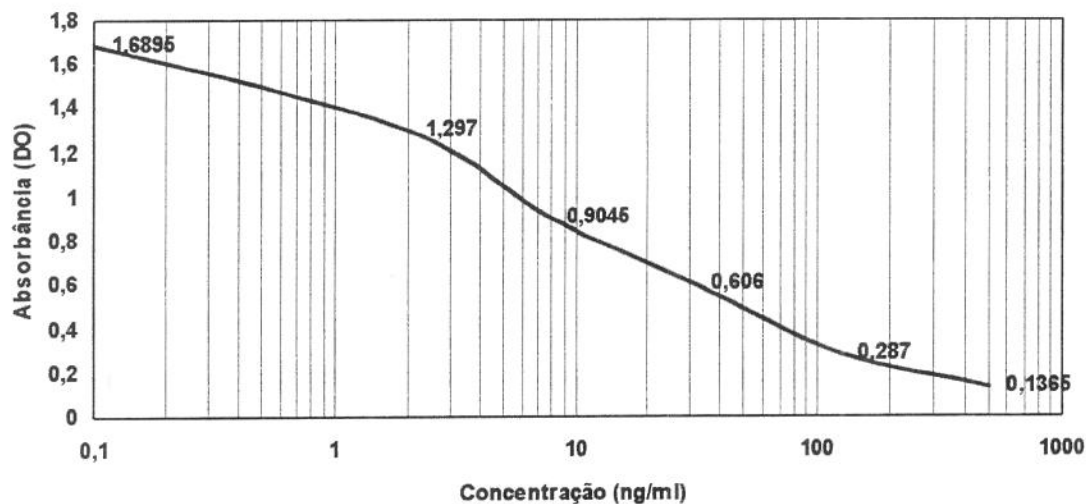


Figura 3- Curva dos padrões relativa ao primeiro *kit* comercial *Human Endostatin™ Protein Accucyte®* para as análises das concentrações da endostatina sérica das pacientes e dos controles

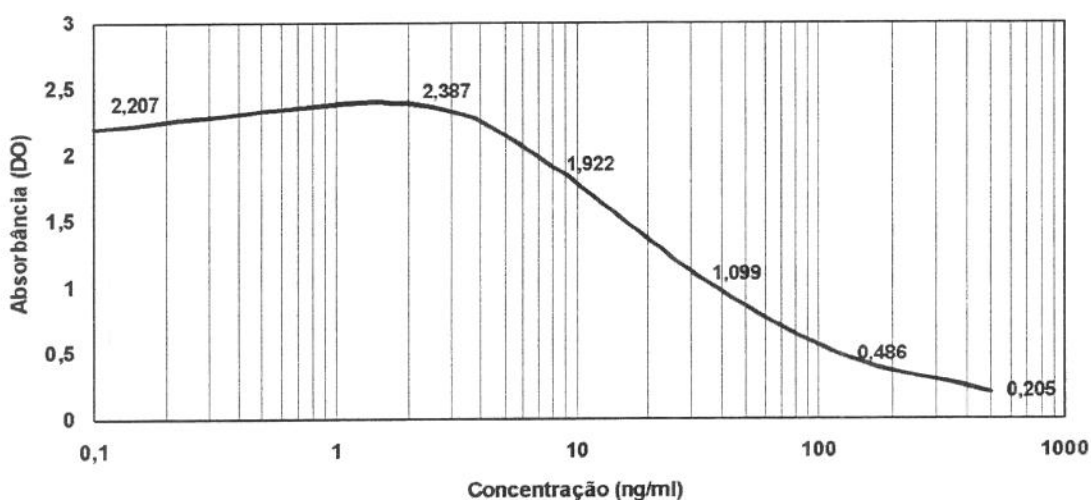


Figura 4- Curva dos padrões relativa ao segundo *kit* comercial *Human Endostatin™ Protein Accucyte®* para as análises das concentrações da endostatina sérica das pacientes e dos controles

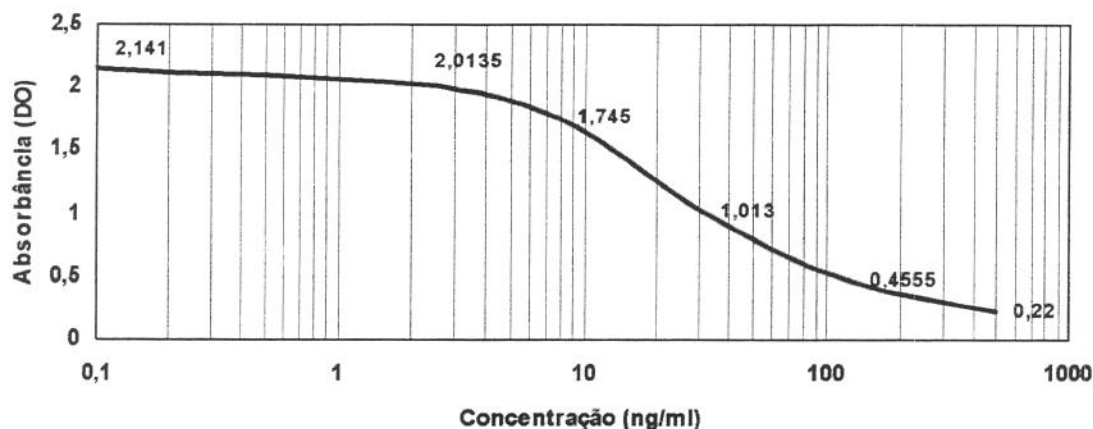


Figura 5- Curva dos padrões relativa ao terceiro *kit* comercial *Human Endostatin™ Protein Accucyte®* para as análises das concentrações da endostatina sérica das pacientes e dos controles

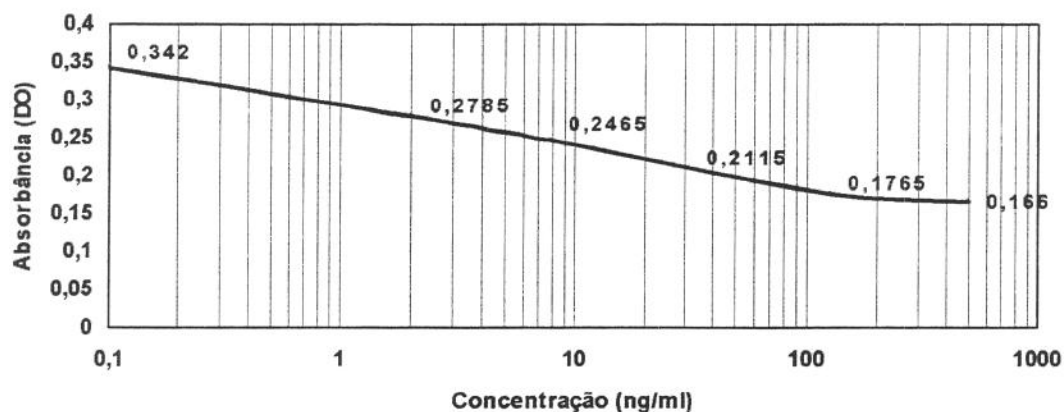


Figura 6- Curva dos padrões relativa ao quarto *kit* comercial *Human Endostatin™ Protein Accucyte®*, para as análises das concentrações da endostatina sérica das pacientes e dos controles

A mediana das concentrações da ES sérica das pacientes (103,88 ng/ml; variação: 30,96 - 417,33) foi maior do que a observada em controles (89,03 ng/ml; variação: 1,95 - 500,00) ($P < 0,001$) (Figura 7).

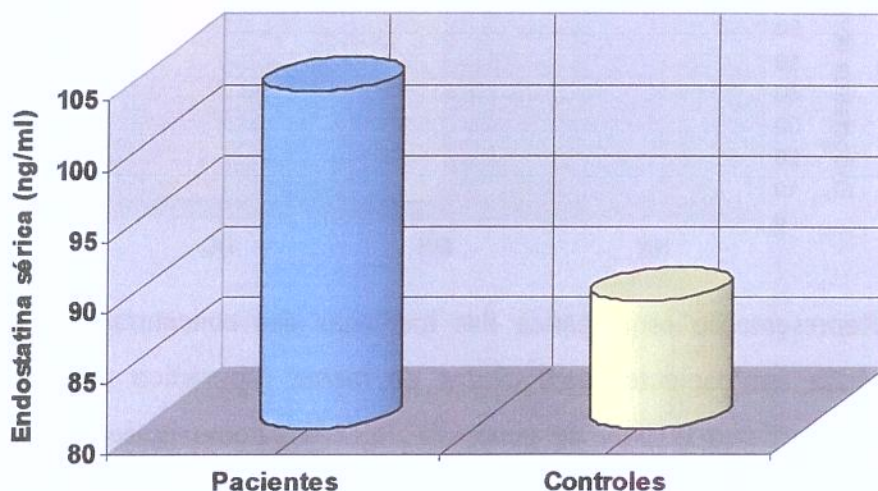


Figura 7- Representação esquemática das medianas das concentrações da endostatina sérica em pacientes com câncer de mama esporádico e controles

Valores similares das medianas foram encontrados em quatro pacientes com o polimorfismo D104N em homozigose (96,28 ng/ml; variação: 86,09 - 126,12), em 10 pacientes com o polimorfismo D104N em heterozigose (98,69 ng/ml; variação: 30,96 - 161,69), e em 104 pacientes sem o polimorfismo (104,83 ng/ml; variação: 33,91 - 417,33) ($P > 0,759$) (Figura 8).

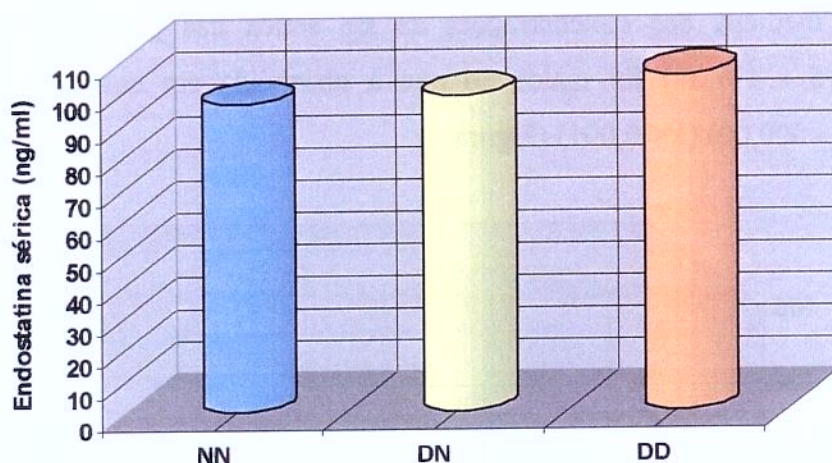


Figura 8- Representação esquemática das medianas das concentrações da endostatina sérica em pacientes com câncer de mama esporádico que apresentaram o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em homozigose (NN), heterozigose (DN) e selvagem (DD)

Também não foram observadas diferenças nas medianas das concentrações séricas da ES em 23 controles com o polimorfismo D104N em heterozigose (107,76 ng/ml; variação: 1,95 - 500,00) e em 135 controles sem o polimorfismo (88,75 ng/ml; variação: 1,95 - 500,00) ($P= 0,535$) (Figura 9).

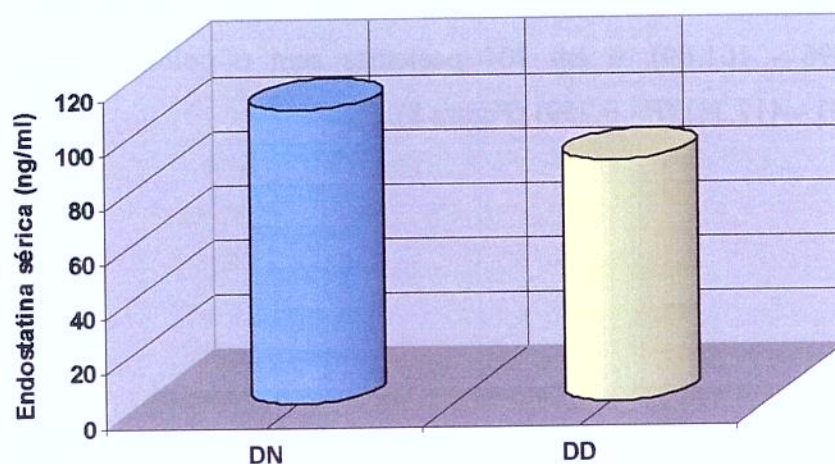


Figura 9- Representação esquemática das medianas das concentrações da endostatina sérica em controles que apresentaram o polimorfismo D104N do gene *COL18*

DISCUSSÃO

O CM é uma das neoplasias malignas mais estudadas nas últimas décadas, devido à sua alta incidência e à alta mortalidade a ela atribuída. Sendo assim, seu comportamento biológico é um dos mais conhecidos dentre as neoplasias malignas. Entretanto, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por ser determinados com exatidão, o que justificou a realização deste estudo.

O risco de CM aumenta com o avanço da idade, devido à exposição da mulher aos próprios hormônios sexuais ou a outros fatores ainda não estabelecidos (HULKA & MOORMAN, 2001, BREASTCANCER.ORG, 2005). O CM é pouco comum antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2005).

Quando as nossas pacientes com CME foram distribuídas por idade, notamos que a idade média, 57 anos, foi semelhante à observada em pacientes da América do Norte, 61 anos, e da Europa, 62 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2005; SANT et al., 1998).

Aparentemente as mulheres afro-descendentes têm um baixo risco de ocorrência de CM quando comparadas com mulheres caucasóides nos Estados Unidos da América (BERNSTEIN et al., 2003; NEWMAN, 2005). Também na África do Sul a incidência da doença foi maior para a população caucasóide do que para a negróide (VOROBIOF et al., 2001), sugerindo uma influência da raça na incidência da doença.

A distribuição dos nossos casos por raça mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides, de forma semelhante às descrições obtidas em outros países (AMBROSONE et al., 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2005). Entretanto, vale comentar que a população brasileira é altamente heterogênea e composta predominantemente por indivíduos miscigenados (ALVES-SILVA et al., 2001; CARVALHO-SILVA et al., 2001), o que indica que os estudos que avaliam a raça, apenas por meio da observação do biótipo, como o nosso estudo, não são totalmente confiáveis.

Entre os fatores de risco do CM destaca-se a exposição da mulher aos próprios hormônios endógenos. Menarca precoce, a que ocorre em mulheres com idade menor do que 12 anos, e menopausa tardia, o que ocorre em mulheres com idade maior do que 50 anos, foram associadas ao aumento do risco de ocorrência do CM (HARRIS et al., 1992;

HULKA & MOORMAN, 2001; ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, 2004). Cerca de metade da nossa casuística (56,9%) teve a primeira menstruação após os 12 anos e a maioria de nossas pacientes estava na menopausa (61,9%). Entre as menopausadas, aproximadamente 30% entraram na menopausa antes dos 50 anos. Esses dados sugerem que outros fatores influenciaram a ocorrência da doença em nosso meio além da exposição da mulher aos próprios hormônios endógenos.

A idade precoce da primeira gestação a termo e a amamentação também parecem relacionadas à redução do risco de ocorrência do CM. A primeira gestação em fase mais tardia da vida reprodutiva faz com que a mulher apresente maior número de ciclos menstruais e, conseqüentemente, esteja submetida a maior ação dos seus próprios hormônios. Ainda, acredita-se que durante a amamentação, estrogênios sejam excretados com o leite materno, poupando a mulher da ação dos seus próprios hormônios (NEWCOMB et al., 1994; HULKA & MOORMAN, 2001; ALBREKTSEN et al., 2005). A maioria das nossas pacientes (73,5%) teve o primeiro filho antes dos 30 anos e 60,8% delas amamentaram por mais de seis meses, sugerindo que estes fatores não foram os únicos determinantes do CM em mulheres do nosso meio.

Resultados de estudos epidemiológicos indicaram um aumento modesto no risco de ocorrência do CM em mulheres menopausadas que fizeram algum tipo de terapia de reposição hormonal (HULKA & MOORMAN, 2001; COLLINS et al., 2005). No entanto, 91,7% das nossas pacientes menopausadas não fizeram nenhum tipo de terapia de reposição hormonal, o que sugere que esta terapêutica não é um fator definitivo para o risco de ocorrência do CM.

A associação entre o hábito de fumar e o CM não está estabelecida (TERRY & ROHAN, 2002; HAMAJIMA et al., 2002). Observamos que a maioria das nossas pacientes com CME não tinham o hábito de fumar.

Em relação aos aspectos anátomo-patológicos do tumor, observamos que cerca de 90% de nossas pacientes apresentaram o carcinoma ductal invasivo, de acordo com descrições prévias (WOOD et al., 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2005).

Também observamos que cerca de 80% dos tumores das nossas pacientes foram classificados como indiferenciados, de forma semelhante aos resultados obtidos em outros estudos (CONWEY et al., 2002; SAUER et al., 2004).

Quando as nossas pacientes foram distribuídas de acordo com o estágio TNM da doença, cerca de 60% delas apresentaram os estágios I e II do tumor, de acordo com descrições prévias (CONWEY et al., 2002; GOODE et al., 2002).

A identificação do padrão de expressão de receptores dos hormônios esteróides em CM é de importância fundamental para a escolha da terapêutica medicamentosa a ser administrada às pacientes, uma vez que a terapia ablativa do estrogênio pode contribuir para a obtenção da remissão da doença em pacientes cujas células tumorais expressam os receptores hormonais (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; DICKSON, 2005).

Nós observamos em nossas pacientes, positividade em cerca de 70% para os receptores de estrogênio e progesterona. Frequências semelhantes de positividade para receptores hormonais em CM foram descritas anteriormente (YANG et al., 2005; JIN et al., 2005; LU et al., 2005).

Em seu conjunto, os resultados deste estudo indicam que as nossas pacientes com CME apresentaram características clínicas e anátomo-patológicas do tumor semelhantes às da doença em outros países e, portanto, constituíram um grupo representativo da doença em nosso meio.

Já é conhecido que a angiogênese é considerada um passo importante para a ocorrência e a progressão do CM (BREM et al., 1978; JENSEN et al., 1982).

A angiogênese resulta da produção de citocinas estimulatórias, como o VEGF (FOX et al., 2001; IM et al., 2001; LANTZCH et al., 2002; FERREIRA & ROCHA, 2004) e o FGF-2 (CHANG et al., 1999) e de citocinas inibitórias, como a ES (O'REILLY et al., 1997; KUROI et al., 2001).

A ES é um fragmento terminal de 20kDa do colágeno XVIII, o produto do gene *COL18A1*, localizado no cromossomo 21 na região q22.3. Atua como inibidora da proliferação e migração de células endoteliais, o mecanismo fundamental para a formação de novos vasos. É também indutora da apoptose destas células, com conseqüente aumento de sobrevivência das mesmas (O'REILLY et al., 1997; DHANABAL et al., 1999; DIXELIUS et al., 2000).

A clivagem do fragmento terminal do colágeno XVIII, que dá origem à ES, é realizada por proteinases como a elastase e a cathepsina L (WEN et al., 1999; FELBOR et al., 2000; FERRERAS et al., 2000).

Os efeitos da ES são mediados por diversos fatores como a integrina $\alpha 5\beta 1$, o sulfato de heparina e a tropomiosina. A ligação da proteína à integrina $\alpha 5\beta 1$, na superfície da célula endotelial, induz a fosforilação da quinase focal de adesão (FAK), que está envolvida na regulação da sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais (REHN et al., 2001; SUDHAKAR et al., 2003). O complexo ES- $\alpha 5\beta 1$, por sua vez, interage com o sulfato de heparina (SASAKI et al., 1999; BLACKHALL et al., 2003) e a caveolina 1 (WICKSTRÖM et al., 2003), na membrana celular das células endoteliais, inibindo genes da família Rho, que em condições normais, têm efeito estimulatório na migração de células endoteliais. Além disso, a ES também pode interagir com a tropomiosina, com conseqüente rompimento de microfilamentos do citoesqueleto de células endoteliais, inibindo a mobilidade e induzindo a morte destas células por apoptose (MACDONALD et al., 2001).

Além disso, a ES compete com os fatores angiogênicos VEGF e FGF-2 pelos mesmos receptores na superfície das células endoteliais, como o receptor KDR/Flk1 (VEGFR2). Caso vença a competição, será observada a inibição da angiogênese (KIM et al., 2002; CHANG et al., 1999; DIXELIUS et al., 2002).

Foi descrito recentemente o polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, localizado na região codificadora da ES (VISA KORPI et al., 1999).

Frequência expressivamente maior do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, em heterozigose, DN, foi observada em pacientes com adenocarcinoma de próstata em comparação a controles, em um estudo conduzido por IUGHETTI et al. (2001). Estes indivíduos estiveram expostos a risco de ocorrência da doença duas vezes e meia maior do que aqueles com o genótipo selvagem DD. Os autores observaram ainda, que as concentrações séricas da ES em pacientes foram semelhantes às observadas em controles. Atribuíram o maior risco de ocorrência da doença em indivíduos com o genótipo DN, à anormalidades funcionais da ES, tendo como base estudos de modelos estruturais da proteína (IUGHETTI et al., 2001).

Entretanto, MACPHERSON et al. (2004) e LI et al. (2005) observaram frequências similares do genótipo DN em pacientes com câncer de próstata e em controles. Ainda, LIU et al. (2003), ORTEGA et al. (2003) e NASCIMENTO et al. (2004) observaram frequências similares do polimorfismo D104N em pacientes com leucemias, mieloma múltiplo e adenocarcinoma colorretal esporádico, respectivamente, e em controles, indicando que o papel do polimorfismo D104N na origem dos tumores não se encontra suficientemente esclarecido.

As amostras de nossos controles avaliadas para o polimorfismo D104N estiveram no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, os controles foram adequados para a avaliação da frequência do polimorfismo gênico na população geral e, conseqüentemente, para a comparação com a frequência obtida em pacientes com CME. Em contraste, as amostras das pacientes não confirmaram a expectativa de Hardy-Weinberg no locus D104N do gene *COL18A1*.

Quando consideramos para a comparação, o genótipo combinado DN mais NN e o genótipo selvagem isolado, observamos frequências similares do genótipo combinado DN mais NN e do genótipo selvagem DD em pacientes e controles. Conseqüentemente, observamos risco de ocorrência da doença similar em indivíduos com os referidos genótipos. Em contraste, quando consideramos para a comparação o genótipo NN isolado e o genótipo DN mais DD, observamos que a frequência do genótipo NN foi expressivamente maior em pacientes do que em controles (2,8% vs 0,0%, respectivamente). É importante ressaltar que não encontramos nenhum controle com o genótipo NN. Observamos que os indivíduos com o genótipo NN apresentaram um risco infinitamente maior de risco da doença do que os indivíduos com os demais genótipos.

Não observamos diferenças entre as frequências do polimorfismo D104N, quando os nossos pacientes foram estratificados por aspectos clínicos e anátomo-patológicos do tumor.

Em nosso conhecimento, não há descrições sobre outras avaliações do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* na susceptibilidade ao CME ou sobre sua associação com aspectos clínicos ou anátomo-patológicos do tumor em pacientes com a doença. Assim, só podemos dizer que o genótipo NN influenciou o risco de ocorrência do

CME em nossas mulheres, mas, não esteve associado a qualquer das características clínicas e anátomo-patológicas do tumor avaliadas em nossos casos. Entretanto, diferenças de manifestações clínicas e anátomo-patológicas do tumor podem não ter alcançado significado estatístico devido ao pequeno número de indivíduos com o genótipo NN inseridos no estudo. Julgamos necessária a inserção de maior número de indivíduos com o genótipo NN nas avaliações, para que possamos obter conclusões consistentes sobre o real papel do genótipo NN em manifestações clínicas e anátomo-patológicas do tumor.

MACPHERSON et al. (2004) realizaram a análise funcional da ES, codificada por alelos selvagem e por alelos D e N, por meio da clonagem e expressão das proteínas. Eles observaram que tanto a proteína com o polimorfismo gênico em heterozigose quanto a proteína em sua forma selvagem, inibiram a proliferação de células endoteliais em cultura de células do cordão umbilical humano. Assim, concluíram que o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* não altera a função da ES. Entretanto, os autores não avaliaram a função da ES codificada apenas por alelos N. Também, não consideraram em seu estudo, a função da ES após interação com seus mediadores, como a $\alpha 5\beta 1$, o sulfato de heparina, a caveolina e a tropomiosina, e com os receptores dos fatores estimuladores da angiogênese, como o VEGF e o FGF-2. Assim, é possível que anormalidades estruturais da proteína polimórfica altere seus sítios de ligação com os mediadores ou que altere sua afinidade aos receptores de membrana de células endoteliais e conseqüentemente com os fatores VEGF e o FGF-2. Para qualquer destas possibilidades, o efeito da ES como inibidor da angiogênese poderia estar reduzido ou abolido, favorecendo a ação dos estimuladores da produção de vasos. Assim, julgamos que estudos adicionais sobre a função da ES são necessários para a obtenção de conclusões consistentes sobre o papel do polimorfismo NN no CME.

A concentração da ES sérica em nossas pacientes ao diagnóstico foi significativamente maior do que a observada em nossos controles. Resultados similares foram obtidos por KUROI et al. (2001) e ZHAO et al. (2004) em pacientes com CM e controles. Entretanto TEH et al. (2004) não encontraram diferenças nas concentrações da ES quando compararam pacientes com CM ao diagnóstico e controles. TEH et al. (2004) e ZHAO et al. (2004) observaram ainda que a concentração da ES foi semelhante em pacientes após a cirurgia para a retirada do tumor do que em pacientes ao diagnóstico.

Atribuíram estes valores ao possível efeito de modulação da ES na formação de vasos inerente ao processo de cicatrização tecidual. É interessante notar que estes resultados sugerem que a ES não é só produzida pelo tumor, mas também por outros tecidos, regulados por possíveis mecanismos envolvidos na cicatrização e remodelação do tecido mamário (TEH et al., 2004).

Observamos valores similares da concentração da proteína em pacientes e em controles com o genótipo DN e DD. Assim, o polimorfismo em heterozigose não pareceu alterar a produção da ES. Por outro lado, valores similares da ES foram também observados em pacientes com o genótipo NN em comparação com aqueles com os outros genótipos. Entretanto, o número de pacientes com o genótipo NN inseridos no estudo pode não ter sido suficiente para possibilitar conclusões consistentes sobre o assunto.

A função da ES humana endógena na angiogênese merece destaque na atualidade. ABDOLLAHI et al. (2004) demonstraram que a ES regula ou modifica a expressão de genes que atuam em várias cascatas de reações que estão relacionadas com a angiogênese, utilizando técnicas de gene-array e análise de função protéica. Os autores observaram que a proteína inibe fatores proangiogênicos, como as proteínas Ids, o fator induzido de transcrição da hipóxia alfa (HIF- α), o fator nuclear de cadeia kappa leve (NF-KB), as efrinas e o fator de sinal de transdução e ativador de transcrição (STAT), relacionados com a regulação e diferenciação celular, direcionamento na progressão tumoral, mediação do fator de necrose tumoral, ação anti-apoptótica e mediação de reguladores do ciclo celular e da angiogênese. Ainda, a ES estimula fatores antiangiogênicos como a trombospondina. Assim, é possível que a ES codificada apenas por alelos N possa apresentar anormalidades funcionais.

Essas observações indicam que o mecanismo de ação da ES é complexo e que envolve inúmeras cascatas de reações, incluindo a ação e interação da proteína em fatores angiogênicos e em fatores antiangiogênicos. Entretanto, ainda permanece desconhecida a ação e a interação da ES no ambiente tumoral.

As altas concentrações da ES encontradas em pacientes podem representar parte de um mecanismo de reação do hospedeiro contra o crescimento do tumor ou resultam simplesmente da ação de proteases por ele secretadas, ou ainda, podem fazer parte dos

mecanismos envolvidos na cicatrização e remodelamento do tecido mamário (TEH et al., 2004; ZHAO et al., 2004).

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem, pela primeira vez, que o genótipo NN do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* está associado ao risco aumentado de CME em nosso país. A confirmação desta associação em indivíduos de outras populações é de fundamental importância para dar suporte à utilização desta genotipagem como um teste preditivo para a identificação da doença. Este teste possibilitaria a identificação de um grupo de mulheres com alto risco de ocorrência da doença, que poderiam ser beneficiadas por exames mais sensíveis e específicos para a identificação precoce da doença, como a ressonância magnética da mama. Além disso, já é possível tratar mulheres com alto risco para o CM, de forma profilática, com o emprego de tratamento alvo com os análogos dos estrogênios, como o citrato de tamoxifeno e com os inibidores da aromatase, como o letrozol e o anastrozol (FICHTNER et al., 2004; LONNING, 2004).

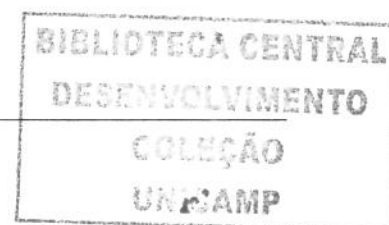
Já é também conhecido o efeito de agentes antiangiogênicos, como o inibidor do VEGF, o bevacizumabe, no tratamento do CM metastático (FERSIS et al., 2004; RHEE & HOFF, 2005; JAIN et al., 2006). Em teoria, este medicamento poderia também ser usado na prevenção da doença em mulheres com alto risco para CM, particularmente quando determinado por um genótipo que aparentemente inibe a neoformação vascular, como o 104NN.

CONCLUSÕES

A frequência aumentada do genótipo NN em pacientes com CME sugere que o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* altera o risco de ocorrência da doença.

A similaridade entre as frequências dos genótipos DD, DN e NN em pacientes estratificadas por aspectos clínicos e anátoma-patológicos do tumor, sugere que o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* não influencia estas manifestações da doença.

A similaridade entre as concentrações de ES em indivíduos com os genótipos DD, DN e NN sugere que o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* não influencia a quantidade da proteína produzida.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, A.; HAHNFELDT, P.; MAERCKER, C.; GRONE, H. J.; DEBUS, J.; ANSORGE, W.; et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. **Mol Cell**, 13(5): 649-663, 2004.

ALBREKTSSEN, G.; HEUCH, I.; KVALE, G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births exploring interaction effects. **Br J Cancer**, 92(1): 167-175, 2005.

ALLRED, D. C.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. Prognostic and predictive factor in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol**, 11: 155-168, 1998.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA-SANTOS, M.; GUIMARAES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, 67: 444-461, 2000.

AGRESTI, A.; FINLAY, B. **Statistical Methods for the Social Sciences**. San Francisco, Dellen Publishing Company, 1986.

AMBROSONE, C. B.; AHN, J.; SINGH, K. K.; REZAISHIRAZ, H.; FURBERG, H.; SWEENEY, C.; et al. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. **Cancer Res**, 65(3): 1105-1111, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts and figures**. Atlanta, Estados Unidos da América, 2005. Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 27 dez. 2005.

ARAP, M. A.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Mecanismos de metástases e angiogênese In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 97-103.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **Projeto Diretrizes**: 1-15, 2001.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e populações**. 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 1-460.

BERNSTEIN, L.; TEAL, C. R.; JOSLYN, S.; WILSON, J. Ethnicity-related variation in breast cancer risk factors. **Cancer**, 97(1): 222-229, 2003.

BERTWISTLE, D.; ASHWOTH A. Functions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, 8: 14-20, 1998.

BLACKHALL, F. H.; MERRY, C. L.; LYON, M.; JAYSON, G. C.; FOLKMAN, J.; JAVAHERIAN, K.; et al. Binding of endostatin to endothelial heparan sulphate shows a differential requirement for specific sulphates. **Biochem J**, 375(1): 131-9, 2003.

BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. **A mama. Tratamento compreensivo das doenças benignas e malignas**. São Paulo, 1994.

BLOOM, H. J. G.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer. **Br J Cancer**, 11: 359-377, 1957.

BORRESEN-DALE, A. L. *TP53* and breast cancer. **Hum Mutat**, 21: 292-300, 2003.

BREASTCANCER.ORG **Understanding breast cancer risk**. Narberth, Estados Unidos da América, 2005. Disponível em <<http://www.breastcancer.org>> Acesso em 27 dez. 2005.

BREM, S. S.; JENSEN, H. M.; GULLINO, P. M. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. **Cancer**, 41(1): 239-244, 1978.

BUTT, A. J.; MCNEIL, C. M.; MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. **Endocr Relat Cancer**, 12(1): 47-59, 2005.

CALVO, A.; FELDMAN, A. L.; LIBUTTI, S. K.; GREEN, J. E. Adenovirus-mediated endostatin delivery results in inhibition of mammary gland tumor growth in C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mice. **Cancer Res**, 62: 3934-3938, 2002a.

CALVO, A.; YOKOYAMA, Y.; SMITH, L. E.; ALI, I.; SHIH, S. C.; FELDMAN, A. L.; et al. Inhibition of the mammary carcinoma angiogenic switch in C3(1)/SV40 transgenic mice by a mutated form of human endostatin. **Int J Cancer**, 101: 224-234, 2002b.

CAPONERO, R. **Guia câncer de mama**. 1. ed., São Paulo, Lemos Editorial, 2003.

CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. D. J. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet**, 68: 281-286, 2001.

CATTORETTI, G.; RILKE, F.; ANDREOLA, S.; D'AMATO, L.; DELIA, D.; P53 expression in breast cancer. **Int J Cancer**, 41:1788-1883, 1988.

CHANG, Z.; CHOON, A.; FRIEDL, A. Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding. **Am J Pathol**, 155(1):71-76, 1999.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, 9(6): 606-16, 2004.

CLARK, G. M. Prognostic and predictive factors. In: HARRIS, J. R.; LIPPMAN, M. E.; MORROW, M.; OSBORNE, C. K. **Diseases of the breast**. Philadelphia: Lippincott Raver Health Care, 1996.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **N Engl J Med**, 344(4): 276-285, 2001.

COLLINS J. A., BLAKE J. M., CROSIGNANI P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Hum Reprod Update**, 11(6): 545-560, 2005.

CONWAY, K; EDMISTON, S. N.; CUI, L.; DROUIN, S. S.; PANG, J.; HE, M.; et al. Prevalence and spectrum of p53 mutations associated with smoking in breast cancer. **Cancer Res**, 62(7): 1987-1995, 2002.

DHANABAL M.; RAMCHANDRAN, R.; WATERMAN M. J. F.; LU, H.; KNEBELMANN, B.; SEGAL, M.; et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **J Biol Chem**, 274: 11721-11726, 1999.

DICKSON, R. B.; PESTELL, R. G.; LIPPMAN, M. E. Cancer of the breast - Molecular Biology of the Breast Cancer. In: DEVITA-JR, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer Principles & Practice of Oncology**. 7.ed. Lippincott Williams & Wilks, 2005.

DING, I.; SUN, J. Z.; FENTON, B.; LIU, W. M.; KIMSELY, P.; OKUMIEFF, P.; et al. Intramural administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in Mca-4 murine mammary carcinomas. **Cancer Res**, 61: 526-531, 2001.

DIXELIUS, J.; LARSSON, H.; SASAKI, T.; HOLMQVIST, K.; LU, L.; ENGSTROM, A.; et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, 95: 3403-3411, 2000.

DIXELIUS, J.; CROSS, M.; MATSUMOTO, T.; SASAKI, T.; TIMPL, R.; CLAESSEON-WELSH, L. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. **Cancer Res**, 62(7): 1944-1947, 2002.

DOWSETT, M.; FOLKERD, E.; DOODY, D.; HAYNES, B. The biology of steroid hormones and endocrine treatment of breast cancer. **Breast**, 14(6): 452-457, 2005.

DUNNING, A. M.; HEALEY, C. S.; PHAROAH, P. D.; TEARE, M. D.; PONDER, B. A.; EASTON, D. F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 8(10): 843-854, 1999.

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) - Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immunotherapy. **Lancet**, 339: 71-85, 1992.

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

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. **The breast. Systemic pathology**, 3th edition, Edinburg: Churchill Livinstone, 1998.

ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Hormones and breast cancer. **Hum Reprod Update**, 10(4): 281-293, 2004.

FELBOR, U.; DREIER, L.; BRYANT, R.A.; PLOEGH, H. L.; OLSEN, B. R.; MOTHES, W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. **EMBO J**, 19(6): 1187-1194, 2000.

FERRERAS, M.; FELBOR, U.; LENHARD, T.; OLSEN, B. R.; DELAISSE, J. et al. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. **FEBS Lett**, 486(3): 247-251, 2000.

FERSIS N., SMYCZEK-GARGYA B., ARMEANU S., GAGULIC E., PANTIC L., RELAKIS K., FRIEDRICH M., WALLWIENER D. Changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) after chemoendocrine therapy in breast cancer. **Eur J Gynaecol Oncol** 25(1):45-50, 2004.

FICHTNER I., BECKER M., ZEISIG R., SOMMER A. In vivo models for endocrine-dependent breast carcinomas: special considerations of clinical relevance. **Eur J Cancer** 40(6): 845-851, 2004.

FISHER, B.; BAUER M.; WICKERHAM, D. L.; REDMOND, C. K.; FISHER, E. R.; CRUZ, A. B.; et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: na NSABP update. **Cancer**, 52: 1551, 1983.

FLEISS, J. L. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 2. ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1981.

FOX, S. B. Angiogenesis: pathological, prognostic and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. **Lancet Oncol**, 2: 278-289, 2001.

FRIERSON, H. F. JR.; WOLBER, R. A.; BEREAN, K. W.; FRANQUEMONT, D. W.; GAFFEY, M. J.; BOYD, J. C.; et al. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. **Am J Clin Pathol**, 103: 195, 1995.

GASPARINI, G.; WEIDNER, N.; BEVILACQUA, P.; MALUTA, S.; DALLA PALMA, P.; CAFFO, O.; et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumor lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers en node-negative breast cancer. **J Clin Oncol**, 122: 454-466, 1994.

GOLD, B.; KALUSH, F.; BERGERON, J.; SCOTT, K.; MITRA, N.; WILSON, K.; et al. Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer. **Cancer Res**, 64: 8891-8900, 2004.

GOODE, E. L.; DUNNING, A. M.; KUSCHEL, B.; HEALEY, C. S.; DAY, N. E.; PONDER, B. A.; et al. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. **Cancer Res**, 62(11): 3052-3057, 2002.

GORDON, N. H. Socioeconomic factors and breast cancer in black and white Americans. **Cancer Metastasis Ver**, 22(1): 55-65, 2003.

GUNEL, N.; AKCALI, Z.; COSKUN, U.; AKYOL, G.; YAMAC, D.; YENIDUNYA, S.; et al. Prognostic importance of tumor angiogenesis in breast carcinoma with adjuvant chemotherapy. **Pathol Res**, 198: 7-12, 2002.

HAMAJIMA, N.; HIROSE, K.; TAJIMA, K.; ROHAN, T.; CALLE, E. E.; HEATH, C. W. JR.; et al. Alcohol, tobacco and breast cancer collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer**, 87(11): 1234-1245, 2002.

HARRIS, J. R.; LIPPMAN, M. E.; VERONESI, U.; WILLETT, W. Breast cancer. **N Engl J Med**, 327(5): 319-328, 1992.

HASLE, H.; CLEMMENSEN, I. H.; MIKKELSEN, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. **Lancet**, 355: 165-169, 2000.

HONG, C. C.; THOMPSON, H. J.; JIANG, C.; HAMMOND, G. L.; TRITCHLER, D.; et al. Association between the T27C polymorphism in the cytochrome P450 c17 α (CYP17) gene and risk factors for breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 88: 217-230, 2004.

HOULSTON, R. S.; PETO, J. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. **Oncogene**, 23: 6471-6476, 2004.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidases-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am J Clin Pathol**, 75: 734-738, 1981.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, 38: 103-116, 2001.

IM, S. A.; KIM, J. S.; GOMEZ-MANZANO, C.; FUEYO, J.; LIU, T. J.; CHO, M. S.; et al. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF. **Br J Cancer**, 84: 1252-1257, 2001.

INDRACCOLO, S.; GOLA, E.; ROSATO, A.; MINUZZO, S.; HABELER, W.; TISATO, V.; et al. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha (1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. **Gene Ther**, 9: 867-878, 2002.

IUGHETTI, P.; SUZUKI, O.; GODOI, P.H.C.; ALVES, V. A.; SERTIE, A. L.; ZORICK, T.; et al. A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. **Cancer Res**, 61: 7375-7378, 2001.

JAIN R.K., DUDA D.G., CLARK J.W., LOEFFLER J.S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 3(1):24-40, 2006

JENSEN, H. M.; CHEN, I.; DEVAULT, M. R.; LEWIS, A. E. Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue: a probable marker for precancer. **Science**, 218(4569): 293-295, 1982.

JIN, Q.; HEMMINKI, K.; ENQUIST, K.; LENNER, P.; GRZYBOWSKA, F.; KLAES, R.; et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. **Clin Cancer Res**, 11(10): 3647-3653, 2005.

JONG, M. M.; NOLTE, I. M.; MEERMAN, G. J.; VAN DER GRAAF, W. T.; OOSTERWIJK, J. C.; KLEIBEUKER, J.; et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. **J Med Genet**, 39: 225-242, 2002.

JOSLYN, A.; WEST, M. Racial differences in breast carcinoma survival. **Cancer**, 88(1): 114-123, 2000.

KELSEY, J. L. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. **Epidemiol Rev**, 15: 256-263, 1993.

KIM, Y. M.; HWANG, S.; KIM, Y. M.; PYUN, B. J.; KIM, T. Y.; LEE, S. T.; et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. **J Biol Chem**, 277(31): 27872-27879, 2002.

KOPANS, D. B. Epidemiologia, etiologia, fatores de risco, sobrevida e prevenção do câncer de mama. In: **Imagem da mama**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica Científica Ltda, 2000a. p. 29-54.

KOPANS, D. B. Estadiamento do Câncer de Mama. In: **Imagem da mama**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica Científica Ltda, 2000b., p. 107-116.

KUROI, K.; TANAKA, C.; TOI, M. Circulating levels of endostatin in cancer patients. **Oncol Rep**, 8: 405-409, 2001.

LANTZCH, T.; HEFLER, L.; KRAUSE, U.; KEHL, A.; GOEPEL, C.; KOELBL, H.; et al. The correlation between immunohistochemically-detected markers of angiogenesis and serum vascular endothelial growth factor in patients with breast cancer. **Anticancer Res**, 22: 1925-1928, 2002.

LEEK, R. D. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. **Anticancer Res**, 21: 4325-4331, 2001.

LI, H. C.; CAI, Q. Y.; SHINOHARA, E. T.; CAI, H.; CAO, C. Endostatin polymorphism 4349G/A(D104N) is not associated with aggressiveness of disease in prostate cancer. **Dis Markers**, 21(1): 37-41, 2005.

LIPPMAN, M. E. Câncer de Mama. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. **Harrison - Medicina Interna**. 15 ed. Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2001. p. 606-613.

LIU, T. C.; PENG, C. T.; LIN, S. F.; CHANG, C. S.; CHEN, T. P.; CHANG, J. G. Association of endostatin D104N with Leukemia. **Kaohsiung J Med Sci**, 19: 1-5, 2003.

LU, H.; SHU, X. O.; CUI, Y.; KATAOKA, N.; WEN, W.; CAI, Q.; et al. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. **Cancer Res**, 65(12): 5015-5019, 2005.

- LONNING, P. E. Aromatase inhibitors in breast cancer. **Endocr Relat Cancer** 11(2): 179-189, 2004.
- MACDONALD, N. J.; SHIVERS, W. Y.; NARUM, D. L.; PLUM, S. M.; WINGARD, J. N.; FUHRMANN, S. R.; et al. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. **J Biol Chem**, 276(27): 25190-25196, 2001.
- MACPHERSON, G. R.; SINGH, A. S.; BENNETT C. L.; VENZON, D. J.; LIEWEHR, D. J.; FRANKS, M. E.; et al. Genotyping and functional analysis of the D104N variant of human endostatin. **Cancer Biol Ther**, 3(12): 1298-1303, 2004.
- MARTINAZZI, M.; CRIVELLI, F.; ZAMPATTI, C.; MARTINAZZI, S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. **Am J Clin Pathol**, 100: 213-217, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas para incidência e mortalidade por câncer 2004** Rio de Janeiro, 2003. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em 27 dez. 2005.
- MITTRA, I.; MCRAE, K. D. A metanalysis of reported correlations between prognostic factors in breast cancer. Does axillary lymph node metastasis represent biology or chronology? **Eur J Cancer**, 27: 1574, 1991.
- MUSS, H. B. Câncer de mama e diagnóstico diferencial dos nódulos benignos. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil - Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 1529-1537.
- NAMBA, H.; MATSUO, K.; FAGIN, J. A. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. **J Clin Invest**, 86(1): 120-125, 1990.
- NASCIMENTO, H.; COY, C.R.S.; GOES, J.R.N.; COSTA, F. F.; LIMA, C. S. P. A polymorphism in the angiogenesis inhibitor, endostatin, in sporadic colorectal adenocarcinoma. **Int J Colorectal Dis**, 19: 499-501, 2004.
- NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Pennsylvania, EUA. Disponível em <<http://www.nccn.org>> Acesso em 27 dez 2005.

- NELSON, H. D.; HUFFMAN, L. H.; FU, R.; HARRIS, E. L.; U.S. Preventive Services Task Force. Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med**, 143(5): 362-379, 2005.
- NEWCOMB, P. A.; STORER, B. E.; LONGNECKER, M. P.; MITTENDORF, R.; GREENBERG, E. R.; CLAPP, R. W. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. **N Engl J Med**, 330(2): 81-87, 1994.
- NEWMAN, B.; AUSTIN, M. A.; LEE, M.; KING, M. C. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85(9): 3044-3048, 1988.
- NEWMAN, L. A. Breast cancer in African-American women. **Oncologist**, 10(1): 1-14, 2005.
- O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, 88(2): 277-285, 1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Histological typing of breast tumours**. 2.ed. Geneva, Suíça, 1981.
- ORTEGA, M.; NASCIMENTO, H.; COSTA, F. F.; TEORI, M. T.; LIMA, C. S. A polymorphism in the angiogenesis inhibitor, endostatin, in multiple myeloma. **Leukemia Research**, 27: 93-94, 2003.
- PARKER, S. L.; DAVIS, K. J.; WINGO, P. A.; RIES, L. A.; HEATH C. W. JR. Cancer statistics by race and ethnicity. **CA Cancer J Clin**, 48: 31-48, 1998.
- PETO, J.; EASTON, D. F.; MATTHEWS, F. E.; FORD, D.; SWERDLOW, A. J. Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study. Office of Population Censuses and Surveys. **Int J Cancer**, 65(3): 275-283, 1996.
- PERLETTI, G.; CONCARI, P.; GIARDINI, R.; MARRAS, E.; PICCININI, F.; FOLKMAN, J.; et al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat mammary tumors. **Cancer Res**, 60: 1793-1796, 2000.

- PIKE, M.C.; KRAILO, M. D.; HENDERSON, B. E.; CASAGRANDE, J. T.; HOED, D. G. Hormonal risk factors, breast tissue age, and the age-incidence of breast cancer. **Nature**, **303**: 767-770, 1983.
- REHN, M.; VEIKKOLA, T.; KUKK-VALDRE, E. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, **98**(3): 1024-1029, 2001.
- RHEE J., HOFF P.M. Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Pharmacother* **6**(10):1701-1711, 2005.
- ROSEN, P. P.; OBERMAN, H. A. Tumors of the mammary gland. **Armad Forces Institute of Pathology**, Washington D.C., 1993.
- RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Lab Invest**, **57**: 112-113, 1987.
- SANT, M.; CAPOCACCIA, R.; VERDECCHIA, A.; ESTEVE, J.; GATTA, G.; MICHELI, A. et al. Survival of women with breast cancer in Europe: variation with age, year of diagnosis and country. The EURO CARE Working Group. **Int J Cancer**, **77**(5): 679-683, 1998.
- SASAKI, T.; LARSSON, H.; KREUGER, J.; SALMIVIRTA, M.; CLAEISSON-WELSH, L.; LINDAHL, U. et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. **EMBO J**, **18**(22): 6240-6248, 1999.
- SAUER, T.; LOMO, J.; GARRED, O.; NAESS, O. Cytologic features of ductal carcinoma in situ in fine-needle aspiration of the breast mirror the histopathologic growth pattern heterogeneity and grading. **Cancer**, **105**(1): 21-27, 2005.
- SAUTER, B. V.; MARTINET, O.; ZHANG, W. J.; MANDELI, J.; WOO, S. L. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. **Proc Natl Acad Sci USA**, **97**: 4802-4807, 2000.
- SINGLETERY, S. E.; ALLRED, C.; ASHLEY, P.; BASSETT, L. W.; BERRY, D.; BLAND, K. I.; et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. **J Clin Oncol**, **20**(17): 3576-3577, 2002.

SUDHAKAR, A.; SUGIMOTO, H.; YANG, C. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100(8): 4766-4771, 2003.

SUNPAWERAVONG, S.; SUNPAWERAVONG, P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. **Asian J Surg**, 28(1): 71-75, 2005.

TEH, S. H.; HILL, A. D.; LEE, A. W.; FOLEY, D.; KENNEDY, S.; YOUNG, L., et al. Raised plasma endostatin levels correlate inversely with breast cancer angiogenesis. **J Surg Res**, 116(1): 165-171, 2004.

TERRY, P. D.; ROHAN, T. E. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 11(10): 953-971, 2002.

TOIKKEN, S.; HELIN, H.; ISOLA, J.; JOENSUU, H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer a 30 year follow-up. **J Oncol**, 10: 10444, 1992.

UZZAN, B.; NICOLAS, P.; CUCHERAT, M.; PERRET, G. Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Cancer Res**, 64(9): 2941-2955, 2004.

VERSCHRAEGEN, C.; VINH-HUNG, V.; CSERNI, G.; GORDON, R.; ROYCE, M. E.; VLASTOS G.; et al. Modeling the effect of tumor size in early breast cancer. **Ann Surg**, 241(2), 309-318, 2005.

VOROBIOF, D. A.; SITAS, F.; VOROBIOF, G. Breast cancer incidence in South Africa. **J Clin Oncol**, 19(18): 125-127, 2001.

WARD, L. S. Genética molecular do câncer: implicações no câncer de tiróide. **Rev Bras Ci Terap**, 23(6): 212-218, 1997.

WELLS, B. L.; HORM, J. W. Stage at diagnosis in breast cancer: race and socioeconomic factors. **Am J Pub Health**, 82(10): 1383-1385, 1992.

WEN, W.; MOSES, M. A.; WIEDERSCHAIN, D.; ARBISER, J. L.; FOLKMAN, J. The generation of endostatin is mediated by elastase. **Cancer Res.**, 59(24): 6052-6056, 1999.

WICKSTRÖM, S. A.; ALITALO, K.; KESKI-OJA, J. Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity. **J Biol Chem**, 278(39): 37895-37901, 2003.

WOOD, W. C.; MUSS, H. B.; SOLIN, L. J.; OLOPADE, O. I. Cancer of the breast. In: DEVITA-JR, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer Principles & Practice of Oncology**. 7.ed. Lippincott Williams & Wilks, 2005.

WOODHEAD, J. L.; FALLON R.; FIGUERED H.; LONGDALE J.; MALCOM, A. D. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K. E. **Human Genetic Diseases - A practical approach**, Oxford: IRL Press, p. 51-64.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, 288(3): 321-333, 2002.

YANG, G.; SHU, X. O.; RUAN, Z. X.; CAI, Q. Y.; JIN, F.; GAO, Y.T.; et al. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. **Cancer**, 103(1): 52-58, 2005.

YOKOYAMA, Y.; GREEN, J. E.; SUKHATME, V. P.; RAMAKRISHNAN, S. - Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model. **Cancer Res**, 60: 4362-4365, 2000.

YOSHIMOTO, M.; TADA, K.; HORI, H.; MOROTA, A.; TANABE, M.; NISHIMURA, S.; et al. Improvement in the prognosis of Japanese breast cancer patients from 1946 to 2001 - an institutional review. **Jpn J Oncol**, 34(8): 457-462, 2004.

ZHAO, J.; YAN, F.; JU, H.; TANG, J.; QIN, J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. **Cancer Lett**, 204(1): 87-95, 2004.

ZORICK, T. S.; MUSTACCHI, Z.; BANDO, S. Y.; ZATZ, M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; OLSEN, B.; et al. High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. **Eur J Human Genet**, 9: 811-814, 2001.

ANEXOS

Carta de consentimento pós - informação a ser obtida dos pacientes, para participação
no estudo intitulado "Influência do Polimorfismo D104N do Gene *COL18A1*
na Susceptibilidade ao Câncer de Mama Esporádico"

Nome do paciente:.....

Idade:.....anos **RG:**..... **HC:**.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente incapacitado):

RG:..... **Grau de parentesco:**.....

Endereço:.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume: 10 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado para a avaliação de uma predisposição genética para o desenvolvimento de câncer de mama. Sei também que um fragmento do meu tumor, retirado para estabelecer o diagnóstico da minha doença, será utilizado para a avaliação algumas características próprias deste tumor. Estou ciente que serei avisado se for constatado que apresentei a predisposição genética ao câncer de mama. Sei também que o meu sangue só será utilizado para avaliar outra predisposição genética se houver aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Maria Salete Costa Gurgel ou a Dra. Julia Yoriko Shinzato do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Tel: 3788 9305 e 3788 9385. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 3788 7232. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador legal

Campinas, / /

Carta de consentimento pós - informação a ser obtida dos indivíduos controle,
para participação no estudo intitulado “Influência do Polimorfismo D104N do
Gene *COL18A1* na Susceptibilidade ao Câncer de Mama Esporádico”

Nome:.....

RG: **Raça:** **Idade:** anos

Endereço residencial:.....

.....

Endereço comercial:.....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei informações sobre a ocorrência de câncer em meus familiares e uma amostra de sangue a ser colhida em veia de um dos braços (volume:10 ml). Estou ciente que este material será utilizado para a avaliação de uma predisposição genética para o desenvolvimento de câncer de mama. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Estou ciente que serei avisado se for constatado que apresentei a predisposição genética ao câncer de mama. Sei também que o meu sangue só será utilizado para avaliar outra predisposição genética se houver aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu atendimento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Carmen Silvia Passos Lima no Hemocentro - UNICAMP. Tel: 3788 8729 e 3788 8640. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas UNICAMP. Tel: 3788 7232.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do indivíduo controle

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador legal

Campinas, / /

Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico, de acordo com a idade, a raça, a idade da menarca, a idade da menopausa, a idade da primeira gestação, a lactação, a terapia de reposição hormonal (TRH) e o hábito do tabagismo

Nº do caso	Paciente	Idade (anos)	Raça	Menarca (anos)	Menopausa (anos)	Parto (anos)	Lactação	TRH	Tabagismo
1	AAS	57	C	15	53	21	S	N	N
2	ANPB	44	C	14	N	29	S	N	N
3	ABA	52	C	12	50	17	S	N	N
4	ACCR	51	C	12	40	16	S	S	N
5	AMTS	81	C	15	50	21	N	N	N
6	AADR	64	C	12	50	20	S	N	N
7	AMCA	36	C	13	N	16	S	N	S
8	AMOS	37	C	14	N	19	S	N	N
9	ASBR	72	C	17	50	17	S	N	N
10	AGLR	48	N	15	N	22	S	N	S
11	ABS	72	C	12	52	16	N	N	S
12	ACB	84	C	15	48	26	S	N	N
13	AAA	73	C	12	45	26	S	N	N
14	AAS	70	C	13	58	19	N	N	N
15	AS	68	N	14	50	21	S	N	N
16	AMR	83	C	IGN	50	IGN	S	N	IGN
17	AMB	72	C	14	48	19	N	N	N
18	APS	52	C	IGN	IGN	IGN	IGN	N	N
19	BT	51	C	12	N	17	N	N	N
20	BCV	68	C	13	HTA	IGN	IGN	N	N
21	CA	78	C	11	53	N	N	N	N
22	CCOA	49	C	13	HTA	24	S	N	S
23	DSBSS	61	C	14	55	N	N	N	N
24	DFT	56	C	12	53	21	S	N	N
25	DB	71	C	16	54	25	N	S	N
26	DMSN	46	C	12	N	N	N	N	N
27	DSB	53	C	12	N	15	S	N	S
28	DNE	77	C	14	50	N	N	N	N
29	DRI	52	C	17	42	37	S	N	N
30	EAR	36	C	14	N	N	N	N	N
31	EAA	39	C	12	N	26	N	N	S
32	EMSS	46	N	13	N	23	S	N	N
33	EPS	57	C	13	45	19	S	N	S
34	ETM	74	C	14	56	20	S	N	N
35	EGC	90	C	14	42	27	S	N	N
36	FPS	87	C	10	50	N	N	N	N
37	FMS	59	C	14	56	N	N	N	S
38	GF	80	N	19	52	33	N	N	N
39	GAS	46	N	12	N	21	N	N	N
40	HR	64	C	13	HTA	20	S	N	N
41	HAB	39	N	13	N	17	S	N	N

42	HAML	53	C	11	45	26	S	N	N
43	ISGJ	41	C	12	N	20	S	N	S
44	IOR	65	C	15	45	N	N	N	N
45	IGS	73	C	13	52	15	S	N	S
46	IBKA	75	C	9	39	22	S	N	S
47	IMA	35	N	14	N	24	N	N	N
48	IBFO	61	C	14	60	19	S	N	N
49	ISA	50	C	16	47	16	S	S	N
50	IMF	53	C	15	48	20	S	N	N
51	ICS	76	N	10	40	24	S	N	S
52	IPS	66	C	12	52	24	S	N	N
53	IEL	70	C	13	43	28	N	N	N
54	JMR	58	C	14	56	19	S	N	N
55	JPS	49	N	12	N	23	N	N	N
56	JFSF	63	C	13	53	18	N	N	N
57	JMRA	59	C	11	52	28	N	N	N
58	JSC	66	N	16	42	40	N	N	S
59	JSB	82	N	12	50	35	N	N	N
60	JACA	74	C	15	53	22	S	N	N
61	JDSC	41	C	13	N	20	N	N	N
62	LFP	47	N	15	N	22	N	N	N
63	LSG	71	C	12	45	N	N	N	N
64	LOSM	39	N	15	N	27	S	N	S
65	LAGR	42	C	12	N	22	S	N	S
66	LCS	64	N	16	50	19	S	N	N
67	MFS	44	N	12	N	N	N	N	N
68	MAG	49	N	16	48	37	S	N	S
69	MABM	60	C	11	40	18	S	N	N
70	MACP	77	C	13	48	23	S	N	N
71	MACS	47	C	13	N	29	N	N	N
72	MAIR	42	C	12	N	19	S	N	N
73	MAJS	76	C	15	50	15	S	N	N
74	MALBB	46	N	11	N	IGN	IGN	N	N
75	MAVT	53	N	17	48	30	N	N	S
76	MAD	79	C	12	55	19	IGN	N	N
77	MAJ	44	N	12	N	18	N	N	N
78	MBRS	58	C	14	43	21	N	N	N
79	MCSP	73	N	11	45	27	N	N	N
80	MCDS	66	C	11	43	19	S	N	N
81	MGGs	75	C	13	45	N	N	N	N
82	MSP	89	N	15	45	40	S	N	N
83	MGCS	38	N	10	N	30	S	N	N
84	MGCB	50	N	13	48	18	S	N	N
85	MGM	41	C	12	N	19	N	N	N
86	MFTS	49	C	12	49	23	S	N	S
87	MLFS	59	N	12	40	17	S	N	N
88	MLZP	67	C	14	45	23	S	N	N
89	MNC	57	N	14	50	28	S	N	N
90	MCOS	37	C	13	N	19	S	N	IGN
91	MCPL	57	C	14	55	25	S	IGN	N
92	MFC	82	C	16	40	17	S	S	N

93	MHS	55	N	16	50	19	S	N	S
94	MHSP	46	C	13	N	20	N	N	S
95	MIS	47	N	17	N	25	S	N	S
96	MIPC	55	C	16	45	N	N	S	N
97	MIGS	72	N	13	55	19	S	N	S
98	MJSV	57	N	13	54	15	S	N	N
99	MJPN	68	N	16	30	N	N	S	N
100	MLC	54	C	17	N	25	N	N	S
101	MLBG	45	C	11	N	28	S	N	S
102	MLCG	75	C	11	50	15	S	N	N
103	MMD	60	C	15	50	40	N	N	N
104	MMB	52	C	13	49	33	S	N	S
105	MNSF	56	C	13	51	25	S	N	N
106	MRSM	57	C	15	45	19	S	N	S
107	MSMA	48	C	16	N	N	N	N	N
108	MTCC	50	C	16	N	20	S	N	N
109	MVPR	40	N	12	N	33	S	N	N
110	MRJ	47	C	14	40	23	S	N	S
111	MQ	63	C	12	42	22	S	N	N
112	MERS	57	C	14	53	23	N	N	N
113	NEF	64	C	11	48	30	S	N	N
114	NDE	42	N	15	N	N	N	N	N
115	NASR	40	N	12	40	16	N	N	S
116	NRS	55	N	11	53	24	N	N	N
117	NRC	40	C	12	N	19	N	N	N
118	NRP	74	C	12	45	24	S	N	N
119	RAS	43	C	11	N	24	S	N	S
120	RMSR	52	C	11	48	30	S	N	S
121	RTNC	60	C	12	55	35	N	N	N
122	RNM	60	C	12	50	25	S	N	S
123	RMD	51	C	11	N	25	N	N	S
124	RAUA	34	C	14	N	29	S	N	N
125	SB	50	C	13	N	17	N	N	N
126	SGA	32	C	12	N	25	N	N	N
127	SRRN	43	C	13	N	23	N	N	N
128	SABO	38	C	13	N	19	S	N	S
129	TTA	66	C	12	45	15	S	N	N
130	TTJ	65	C	15	42	16	S	N	N
131	TJO	47	C	11	N	22	S	N	N
132	TTR	67	C	14	55	25	S	N	S
133	UG	81	C	12	40	N	N	N	N
134	VBS	65	C	16	55	19	N	N	N
135	VLSF	55	C	15	43	20	S	N	N
136	VLVL	50	N	15	46	24	S	N	N
137	VDB	45	C	11	N	23	S	N	N
138	VNC	58	C	12	55	30	S	N	S
139	VSG	70	C	15	50	17	S	N	N
140	ZPD	62	C	11	45	21	S	N	N
141	AAL	80	C	15	50	22	S	N	N
142	AFS	74	N	10	36	15	S	N	N
143	AGR	80	C	14	46	19	S	N	N

144	AFRB	47	C	12	N	25	S	N	S
145	AGS	37	C	16	N	21	S	N	S
146	COS	43	C	16	N	25	S	N	N
147	DF	32	C	11	N	N	N	N	N
148	ISL	60	C	12	54	15	N	N	S
149	IAD	71	N	11	50	IGN	S	N	N
150	LDCA	63	N	15	48	24	S	N	N
151	LSS	51	C	12	41	26	N	N	N
152	MMB	52	C	IGN	IGN	IGN	IGN	IGN	IGN
153	MIOC	55	C	16	45	N	N	S	N
154	MJA	62	N	11	52	22	S	N	N
155	MJFL	57	C	15	N	37	N	N	N
156	MSO	43	C	14	N	18	S	N	S
157	VMON	44	N	17	N	25	S	N	N
158	ATRB	42	C	12	N	21	S	N	S
159	SRSC	29	C	12	N	18	S	N	N
160	IFNS	48	C	12	N	25	S	N	S
161	VEC	57	C	14	52	35	S	N	N
162	MTR	43	C	43	N	26	S	N	N
163	AAB	69	C	13	52	20	S	N	N
164	CBN	47	C	14	41	20	S	N	S
165	MCLS	53	C	12	N	31	N	N	N
166	MJCO	51	C	14	N	22	N	N	S
167	PZS	86	C	12	50	IGN	S	N	N
168	BTS	62	C	12	47	22	S	N	N
169	AJR	73	C	14	50	23	N	N	N
170	ISS	62	C	15	48	IGN	N	N	S
171	MSSG	48	C	15	47	24	S	N	N
172	CCM	68	N	12	44	N	N	N	N
173	MAS	61	N	17	HTA	20	S	S	N
174	RCOR	43	C	11	N	27	S	N	N
175	EFR	58	C	13	50	28	S	N	N
176	JSSL	54	C	13	50	21	S	N	N
177	DDP	70	C	13	50	24	S	S	N
178	OBR	49	C	16	N	17	S	N	N
179	BVP	55	C	9	HTA	N	N	S	N
180	SPG	57	C	12	HTA	25	S	S	N
181	SJM	61	C	13	46	23	S	N	N

IGN= idade ou informação ignorada; raça: C= caucasóide; N= negróide; menopausa: N= ainda menstrua; HTC= hysterectomizada; parto: N= nunca engravidou; lactação: S= amamentou por seis meses ou maior período; N= não amamentou ou amamentou menos de seis meses; TRH: S= fez uso de terapia de reposição hormonal; N= não fez uso de terapia de reposição hormonal; tabagismo: S=fuma atualmente ou parou há menos de dez anos; N= nunca fumou ou parou há mais de dez anos

Distribuições dos 448 doadores de sangue, que serviram como controles, de acordo com a idade, o sexo, a raça, a presença ou ausência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* e a concentração da endostatina sérica

Nº do caso	Doador	Idade	Sexo	Raça	D104N	Endostatina (ng/ml)
1	MARC	57	F	C	DD	NR
2	PBS	51	M	C	DD	NR
3	SMS	54	M	N	DD	NR
4	MLVS	57	F	C	DD	NR
5	MHPS	51	F	C	DN	1,950
6	EPT	59	M	N	DD	NR
7	NPS	55	M	C	DD	NR
8	NGAB	50	F	C	DD	NR
9	MVG	57	M	C	DN	NR
10	AAG	54	M	C	DD	84,910
11	FB	54	M	C	DN	NR
12	WMC	52	M	C	DD	NR
13	JFN	59	M	C	DD	NR
14	NMIG	53	F	C	DD	146,333
15	JC	52	M	C	DN	NR
16	CD	54	M	C	DD	97,510
17	BE	53	M	C	DD	NR
18	JAS	51	M	N	DD	NR
19	CSF	52	F	C	DD	91,540
20	JAN	52	M	N	DD	NR
21	MPSL	57	F	C	DD	NR
22	JFS	57	M	C	DD	111,660
23	ART	53	M	C	DD	NR
24	NS	56	M	N	DD	NR
25	ET	55	M	C	DD	NR
26	JCAN	53	M	N	DD	NR
27	JRC	50	M	C	DD	NR
28	DISD	51	F	C	DD	NR
29	ANP	56	M	C	DD	NR
30	JCS	50	M	C	DD	NR
31	MSS	57	F	N	DD	395,361
32	OJ	58	M	C	DD	NR
33	VO	50	M	C	DD	NR
34	MJS	53	M	C	DD	NR
35	EGO	57	M	C	DD	NR
36	LTG	51	F	C	DD	157,172
37	JML	50	M	C	DD	NR
38	HJM	50	M	C	DD	NR
39	EPA	50	F	C	DD	NR
40	MC	55	M	C	DD	NR
41	MN	53	M	C	DD	126,330
42	ADC	52	M	C	DD	NR
43	BFPC	58	M	N	DD	NR

44	VPT	50	M	N	DD	NR
45	APM	56	M	C	DD	NR
46	SR	56	M	C	DD	NR
47	JBBM	51	M	C	DD	NR
48	MLS	56	F	C	DD	NR
49	MGB	54	M	C	DD	131,840
50	GPS	51	M	C	DD	75,690
51	JS	50	M	N	DD	NR
52	LTO	58	F	C	DD	NR
53	EBN	52	M	C	DD	NR
54	UT	50	M	C	DD	NR
55	JGS	53	M	C	DN	NR
56	JGAS	55	M	C	DN	NR
57	PJS	55	M	C	DD	NR
58	ASL	57	F	C	DD	NR
59	DAS	53	M	C	DD	NR
60	PAS	55	M	C	DD	NR
61	ALA	52	F	C	DD	NR
62	JGSS	52	M	C	DD	NR
63	JRC	51	M	C	DD	127,370
64	JPS	55	M	C	DD	NR
65	JCL	53	M	C	DD	NR
66	JMF	51	M	C	DD	NR
67	IRP	56	F	C	DD	NR
68	LAS	56	F	C	DD	NR
69	OM	50	M	C	DD	NR
70	AVG	52	F	C	DD	115,252
71	DAA	50	M	N	DD	NR
72	NY	58	M	A	DD	NR
73	JMS	53	F	C	DD	175,592
74	VSPF	56	F	C	DN	NR
75	JAF	59	M	C	DD	NR
76	JAC	58	M	C	DD	NR
77	CD	53	M	N	DD	NR
78	AD	52	M	C	DD	NR
79	HCL	56	F	C	DD	NR
80	LGO	57	M	C	DD	NR
81	WMS	57	M	C	DD	NR
82	RBAN	56	M	C	DD	NR
83	ABS	51	M	C	DD	NR
84	AOL	55	M	C	DD	NR
85	EB	56	M	C	DD	NR
86	MABB	51	F	C	DD	NR
87	ACF	50	M	C	DD	NR
88	TAF	50	F	N	DN	NR
89	FLGF	50	M	C	DD	NR
90	ABCM	55	M	C	DD	NR
91	PNOS	56	M	C	DD	NR
92	VA	54	M	C	DD	NR
93	CJF	52	M	C	DD	NR
94	LGT	59	M	C	DD	NR

95	ARS	58	M	N	DD	NR
96	AR	50	M	N	DD	NR
97	EFS	51	M	N	DD	NR
98	LM	53	M	N	DN	NR
99	VA	55	M	C	DD	1,950
100	ORP	56	M	C	DD	NR
101	MCP	50	F	C	DD	157,172
102	JAS	57	M	C	DD	NR
103	JPML	52	M	C	DN	30,410
104	HPL	58	M	N	DD	NR
105	JSN	58	M	C	DN	NR
106	AS	51	M	C	DD	NR
107	JSFP	50	M	C	DN	NR
108	SPU	50	F	C	DN	NR
109	CAP	50	M	C	DD	NR
110	AB	51	M	N	DD	NR
111	FD	52	M	C	DD	NR
112	BB	57	M	C	DD	NR
113	SFR	56	M	C	DD	NR
114	EFS	52	M	N	DD	NR
115	BA	56	M	C	DD	NR
116	JPA	57	M	C	DD	15,450
117	ALG	51	M	C	DD	NR
118	ACB	56	M	C	DD	NR
119	RRE	55	M	C	DD	NR
120	NC	51	M	C	DD	21,390
121	ACC	50	M	C	DD	NR
122	ARP	50	M	C	DN	112,560
123	SB	50	M	C	DN	NR
124	MPM	59	F	C	DD	324,533
125	MJGJ	51	F	N	DD	NR
126	RFM	58	M	C	DD	NR
127	LC	56	M	C	DD	NR
128	ECB	49	F	C	DD	NR
129	MJB	58	M	C	DD	NR
130	ST	50	M	N	DD	NR
131	LASB	55	M	C	DD	NR
132	MHP	60	M	C	DD	NR
133	OC	51	M	C	DN	32,060
134	JDS	60	M	C	DD	NR
135	GTL	53	M	C	DD	NR
136	IF	57	M	C	DD	NR
137	JVF	53	M	C	DD	NR
138	CAF	51	M	C	DD	NR
139	FPB	50	M	N	DD	7,590
140	WF	60	M	C	DD	NR
141	GTS	51	M	N	DD	NR
142	JS	54	M	C	DD	NR
143	ALF	51	M	C	DD	NR
144	OSR	50	M	C	DD	NR
145	BC	56	M	C	DD	NR

146	ACC	52	M	C	DD	NR
147	KK	56	M	C	DD	NR
148	JPLF	52	M	C	DD	NR
149	AS	51	M	C	DD	NR
150	JMS	50	M	C	DD	142,820
151	JCM	50	M	C	DD	76,460
152	BJZ	52	M	N	DD	110,760
153	CM	59	M	C	DD	NR
154	MS	54	M	C	DD	NR
155	CR	51	F	C	DN	113,361
156	AFDO	59	F	N	DD	NR
157	JAS	59	M	C	DD	NR
158	ACSR	52	M	C	DD	NR
159	JRF	55	M	N	DD	NR
160	ST	54	M	C	DD	NR
161	ACS	50	M	C	DD	121,080
162	ECC	52	M	C	DN	NR
163	MFN	51	M	C	DD	59,220
164	ZF	54	F	C	DD	NR
165	ESR	60	M	N	DD	NR
166	FS	51	M	C	DD	32,060
167	JMHM	55	M	C	DD	NR
168	RBM	56	M	C	DD	1,950
169	LO	52	M	N	DD	NR
170	JRS	55	M	C	DD	NR
171	CPL	53	F	C	DD	144,760
172	TJPR	54	F	C	DD	NR
173	LSS	53	M	C	DN	NR
174	AC	54	M	C	DD	NR
175	VAB	53	M	C	DD	NR
176	SPB	51	M	C	DD	NR
177	ECL	50	M	C	DD	56,500
178	DB	52	M	C	DD	NR
179	AP	59	M	C	DD	NR
180	LAL	54	M	C	DD	NR
181	ARO	51	M	C	DD	NR
182	RM	51	M	C	DD	NR
183	AR	58	M	C	DD	NR
184	AJ	52	M	C	DD	NR
185	MRS	53	M	C	DD	NR
186	LG	56	M	C	DN	NR
187	MCT	58	F	C	DD	NR
188	SN	55	M	C	DD	56,170
189	FAZ	50	M	C	DD	NR
190	AG	52	M	C	DD	NR
191	LFS	51	M	C	DN	NR
192	LOR	58	F	C	DD	NR
193	PR	53	M	C	DD	73,290
194	JEP	58	M	C	DD	NR
195	JSB	57	M	C	DD	NR
196	MAT	52	F	C	DD	134,040

197	JCQ	55	M	C	DD	NR
198	AB	56	M	C	DD	88,750
199	JIA	55	M	N	DD	NR
200	FBF	52	M	C	DD	NR
201	RM	54	M	C	DN	NR
202	CM	54	F	C	DN	NR
203	DLS	56	F	C	DD	NR
204	AAZ	57	F	C	DD	185,954
205	JVR	54	M	N	DD	NR
206	MBM	58	F	C	DD	NR
207	JFS	51	M	C	DD	1,950
208	IMLC	52	F	C	DD	64,640
209	CCP	57	M	C	DD	NR
210	TFM	53	F	C	DD	7,370
211	AMSC	54	F	N	DD	209,517
212	FDF	59	M	C	DD	NR
213	JLS	52	M	C	DD	NR
214	AABP	54	F	C	DD	113,361
215	JAS2	51	M	C	DD	73,160
216	ASF	52	M	C	DD	NR
217	WF	56	M	N	DD	NR
218	LS	52	M	C	DD	NR
219	MJS	53	M	C	DD	NR
220	WAC	57	M	C	DD	NR
221	LAS	58	M	C	DD	NR
222	AC	53	M	C	DD	NR
223	BTN	55	M	C	DN	NR
224	AB	50	M	C	DD	39,640
225	ALR	53	M	C	DN	NR
226	JAS	55	M	N	DD	31,600
227	RAL	50	M	C	DD	NR
228	AR	55	M	C	DD	NR
229	OF	52	M	C	DD	NR
230	JBO	51	M	C	DD	NR
231	CVS	55	M	N	DD	NR
232	JAR	60	M	C	DD	NR
233	AB	58	M	C	DD	NR
234	JRS	51	M	C	DN	NR
235	WVS	52	M	C	DD	93,040
236	JS	51	M	C	DD	NR
237	MACG	52	F	C	DN	NR
238	MARSM	50	F	C	DD	NR
239	EPI	58	F	C	DD	NR
240	DMB	54	F	C	DD	NR
241	JSN	59	M	C	DN	NR
242	EAC	51	M	C	DD	NR
243	CSF	53	F	C	DD	NR
244	MSF	59	M	C	DN	NR
245	CMC	50	F	C	DN	107,906
246	EAB	55	F	C	DD	222,996
247	ONISM	52	F	C	DD	NR

248	BA	55	F	C	DD	NR
249	GSPS	56	F	C	DD	36,240
250	MSOR	54	F	C	DD	NR
251	DFG	60	M	C	DN	NR
252	BMSJ	54	F	C	DD	NR
253	EF	60	F	C	DD	NR
254	MPSG	50	F	N	DD	NR
255	ALFR	51	F	N	DD	NR
256	GMC	58	F	C	DD	NR
257	MSCO	53	F	C	DD	76,330
258	NRP	52	F	C	DD	NR
259	MJC	53	F	C	DN	NR
260	TAF	51	F	N	DN	NR
261	SCM	56	F	C	DD	NR
262	MDAL	52	F	C	DN	NR
263	CST	58	F	C	DN	NR
264	DAA	53	F	C	DD	NR
265	MVCN	55	M	C	DD	NR
266	IZS	50	F	C	DD	NR
267	AMSB	52	F	C	DD	23,490
268	MJL	59	F	C	DD	NR
269	MCS	56	F	N	DD	NR
270	MASF	58	F	C	DD	NR
271	ROP	50	F	C	DN	NR
272	OBSB	55	F	C	DD	99,740
273	MQCV	53	F	C	DD	NR
274	CAS	58	F	C	DD	178,592
275	ASS	51	F	C	DD	NR
276	MAP	53	F	C	DD	NR
277	LFC	53	F	C	DN	218,361
278	MLGF	55	F	C	DN	107,760
279	MGR	56	F	C	DD	NR
280	EZO	57	F	C	DN	NR
281	CO	51	F	C	DD	NR
282	EMRS	55	F	C	DD	NR
283	AEPC	51	F	C	DD	NR
284	AEPO	54	F	C	DD	NR
285	DJB	59	F	C	DN	324,533
286	MMS	59	F	C	DD	NR
287	MCS	56	F	N	DD	NR
288	IGM	51	F	C	DD	NR
289	EFL	50	F	C	DD	125,500
290	MCVR	53	F	C	DN	NR
291	HTM	56	F	C	DD	NR
292	LC	57	F	C	DD	NR
293	MHZ	54	F	C	DD	NR
294	EPD	54	F	C	DD	NR
295	NPC	57	F	C	DD	NR
296	MHS	51	F	C	DD	137,420
297	DCF	58	F	C	DD	NR
298	ZVZ	53	F	C	DN	140,210

299	MAM	51	F	C	DD	125,300
300	IGSB	50	F	C	DD	96,720
301	DRS	50	F	N	DD	NR
302	MCBF	56	F	C	DD	47,076
303	MFRV	51	F	C	DD	92,060
304	MCG	40	F	C	DD	NR
305	RBB	54	F	C	DN	64,941
306	CASN	47	F	N	DD	NR
307	VLES	40	F	C	DD	73,948
308	MIBA	44	F	C	DD	NR
309	TABM	53	F	C	DD	98,895
310	ZVS	56	F	C	DN	205,295
311	LMH	33	F	C	DD	NR
312	GJL	25	M	C	DD	NR
313	COB	53	F	C	DD	107,598
314	MNSA	46	F	C	DD	95,918
315	LNS	51	F	C	DD	98,326
316	AMPA	43	F	C	DD	NR
317	AS	45	F	C	DD	NR
318	CMTC	46	F	C	DD	58,643
319	SBSF	55	F	C	DD	NR
320	ACCS	45	F	C	DD	91,705
321	EFB	47	F	C	DD	1,950
322	AAVB	42	F	N	DD	84,876
323	IAGMS	49	F	C	DD	NR
324	NFAL	49	F	C	DD	82,589
325	LCSS	41	F	C	DD	73,662
326	NS	49	F	C	DD	NR
327	RAO	43	F	C	DD	NR
328	IACL	41	F	C	DD	NR
329	LAR	44	F	N	DD	9,893
330	RAFM	47	F	C	DD	96,954
331	HPC	45	F	C	DN	1,950
332	IMFC	42	F	C	DD	55,349
333	LSO	54	F	C	DD	90,513
334	AMA	45	F	C	DD	1,950
335	EPC	47	F	C	DD	63,607
336	AFR	45	F	N	DD	108,477
337	MAP2	53	F	C	DD	91,823
338	AS	44	F	C	DD	NR
339	MAOM	50	F	C	DN	86,620
340	KDLA	42	F	C	DD	NR
341	FACP	44	F	C	DD	NR
342	EFN	48	F	C	DD	71,922
343	ASM	43	F	C	DD	NR
344	JLB	52	F	C	DN	115,252
345	AHLB	42	F	C	DD	113,361
346	ASA	46	F	C	DD	NR
347	EETR	51	F	N	DN	201,198
348	LENA	51	F	C	DD	NR
349	AFIA	44	F	C	DD	NR

350	HN	31	F	N	DD	NR
351	HELO	33	F	N	DD	NR
352	MAR	40	F	C	DD	57,699
353	LFN	50	F	C	DD	1,950
354	EACL	51	F	C	DD	NR
355	LFS	44	F	C	DD	37,369
356	AS	45	F	C	DD	65,105
357	MNSB	42	F	C	DD	NR
358	AMG	48	F	C	DD	NR
359	LGC	49	F	C	DD	95,918
360	MLMR	45	F	C	DD	NR
361	MSES	41	F	N	DD	1,950
362	MAPM	41	F	C	DD	62,412
363	ASL	62	F	C	DD	NR
364	LL	56	F	C	DD	99,123
365	VAS	55	F	C	DN	NR
366	MATM	49	F	C	DD	114,582
367	JMS	56	F	C	DD	1,950
368	AMP	43	F	C	DD	46,313
369	AB	43	F	C	DD	NR
370	MVAS	48	F	C	DD	NR
371	MPS	42	F	C	DD	84,876
372	SAB	46	F	N	DD	68,763
373	GAS	54	F	C	DD	NR
374	APC	54	F	C	DN	500,000
375	MLAC	54	F	C	DN	61,540
376	MASS	43	F	C	DD	NR
377	MNOS	43	F	N	DN	1,950
378	BRB	51	F	C	DD	254,267
379	CCT	52	F	C	DD	372,624
380	MABR	55	F	N	DD	266,233
381	MISB	40	F	C	DD	480,462
382	VLFG	43	F	C	DD	324,533
383	LLB	47	F	C	DD	169,133
384	OCPS	45	F	C	DD	41,653
385	MLMG	43	F	C	DD	500,000
386	CAPP	40	F	C	DD	NR
387	AMDA	47	F	C	DD	NR
388	ASA2	49	F	C	DD	NR
389	RMFM	49	F	C	DD	NR
390	SCM2	42	F	C	DD	65,921
391	ELMR	43	F	C	DD	500,000
392	OPS	57	F	C	DD	69,833
393	SSD	47	F	C	DD	NR
394	EARS	40	F	C	DD	1,950
395	MMBM	42	F	C	DD	89,309
396	MWAR	47	F	C	DD	NR
397	RAV	43	F	C	DN	86,497
398	MRC	41	F	C	DD	248,599
399	AMLDS	41	F	N	DN	75,919
400	ISM	44	F	C	DD	76,472

401	TENF	45	F	C	DD	NR
402	LMSS	47	F	C	DD	NR
403	AF	41	F	C	DD	1,950
404	EAP	45	F	C	DD	72,652
405	NRSO	41	F	C	DD	NR
406	MJSO	39	F	C	DD	131,853
407	RMC	52	F	N	DD	94,293
408	AFGEP	43	F	N	DD	37,719
409	FMSB	44	F	C	DD	1,950
410	MDS	54	F	N	DD	1,950
411	AGO	45	F	C	DD	95,339
412	AMLC	41	F	N	DD	66,724
413	IA	46	F	C	DD	64,941
414	MPB	48	F	C	DD	1,950
415	MDSR	40	F	C	DN	NR
416	MLSL	56	F	C	DD	67,831
417	ISD	54	F	C	DN	48,552
418	CBL	56	F	C	DD	123,207
419	EJSN	44	F	C	DD	308,127
420	ISS	45	F	C	DD	272,255
421	AVOAS	41	F	C	DD	213,871
422	MFLDP	49	F	C	DD	266,233
423	WSS	46	F	N	DD	NR
424	GLZG	47	F	C	DD	169,133
425	TAP	41	F	C	DD	1,950
426	ACDG	52	F	C	DD	NR
427	ES	48	F	C	DD	1,950
428	INF	48	F	C	DD	NR
429	IMV	50	F	C	DD	1,950
430	ASL	40	F	C	DD	69,071
431	PS	44	F	N	DD	434,291
432	DCRM	41	F	C	DD	197,220
433	EMF	53	F	C	DD	NR
434	AIMS	48	F	N	DD	232,727
435	ZLD	45	F	C	DN	160,050
436	LAS	53	F	C	DD	1,950
437	DMM	43	F	C	DD	1,950
438	OAL	45	F	N	DD	NR
439	MASR	46	F	N	DD	1,950
440	JABS	45	F	C	DD	1,950
441	AMSC	40	F	C	DD	14,506
442	AAO	52	F	C	DD	131,853
443	CAV	46	F	N	DD	279,120
444	IAN	27	F	N	DD	NR
445	SG	25	F	C	DD	NR
446	MMOB	31	F	C	DD	NR
447	AD	34	F	C	DN	NR
448	MMTM	43	F	C	DD	NR

F= feminino; M= masculino; C= caucasiano; N= negroide; A= asiático; DD= indivíduos com alelos selvagens; DN= indivíduos com o polimorfismo em heterozigose; NR= não realizado

Distribuições das 181 pacientes com câncer de mama esporádico, de acordo com o tipo histológico, grau de diferenciação, grau nuclear, o estágio TNM do tumor e os padrões de receptores hormonais

Nº do caso	Paciente	Tipo histológico	Grau de diferenciação	Grau nuclear	Estágio TNM	RE	RP
1	AAS	CDI	III	III	I	P	N
2	ANPB	CDI	II	II	IIB	P	P
3	ABA	CDI	III	II	IV	NR	NR
4	ACCR	CDI	III	II	IIA	P	P
5	AMTS	colóide	NA	NA	IIA	NR	NR
6	AADR	CDI	III	III	IIB	N	N
7	AMCA	CDI	III	II	IIB	P	P
8	AMOS	CDI	II	II	IIB	P	P
9	ASBR	colóide	NA	NA	IIIB	NR	NR
10	AGLR	ductal + colóide	NA	NA	IV	N	N
11	ABS	CDI	III	II	IIIA	N	N
12	ACB	CDI	III	II	IIIB	N	N
13	AAA	CDI	III	II	IIIB	P	P
14	AAS	CDI	III	II	IIIB	P	P
15	AS	CDI	III	III	IIIB	NR	NR
16	AMR	CDI	III	III	IIIB	P	P
17	AMB	CDI	III	II	I	P	P
18	APS	CDI	III	II	IIA	P	P
19	BT	lobular	NA	NA	IIB	P	P
20	BCV	CDI	III	II	IIIB	P	P
21	CA	CDI	III	II	IVC	P	P
22	CCOA	CDI	III	III	IIIA	P	P
23	DSBSS	CDI	III	II	IIB	P	P
24	DFT	CDI	III	II	IIA	P	P
25	DB	CDI	III	II	IIIA	P	P
26	DMSN	CDI	III	III	IIIB	NR	NR
27	DSB	CDI	III	II	IIB	N	N
28	DNE	CDI	III	II	IIIB	N	N
29	DRI	CDI	III	III	IIIB	N	N
30	EAR	CDI	III	II	I	P	P
31	EAA	CDI	III	III	IIIB	P	P
32	EMSS	CDI	III	III	IIB	P	P
33	EPS	CDI	III	III	IIIA	N	N
34	ETM	CDI	III	II	I	P	P
35	EGC	CDI	II	II	IIB	P	P
36	FPS	colóide	NA	NA	IIA	NR	NR
37	FMS	CDI	III	II	IV	P	P
38	GF	CDI	III	III	IIIB	P	P
39	GAS	CDI	III	III	IIA	P	P
40	HR	CDI	III	II	IIIA	P	P
41	HAB	CDI	III	III	IIIA	N	N
42	HAML	CDI	III	III	I	P	P

43	ISGJ	CDI	II	III	IIB	N	P
44	IOR	CDI	II	III	IIIB	N	N
45	IGS	CDI	III	II	IIB	P	P
46	IBKA	CDI	III	II	IIA	P	P
47	IMA	CDI	III	II	IIIB	N	N
48	IBFO	CDI	III	III	IIA	P	P
49	ISA	CDI	III	III	IIB	N	P
50	IMF	CDI	III	III	IIIA	N	N
51	ICS	CDI	III	III	IIA	NR	NR
52	IPS	colóide	NA	NA	I	P	P
53	IEL	CDI	II	III	IIA	N	N
54	JMR	CDI	III	III	IIIA	N	N
55	JPS	CDI	II	III	IIIB	P	N
56	JFSF	CDI	I	II	I	P	P
57	JMRA	CDI	III	II	IIB	P	P
58	JSC	CDI	III	II	IIIB	P	N
59	JSB	CDI	II	III	IV	NR	NR
60	JACA	CDI	III	III	IIA	P	N
61	JDSC	CDI	III	III	IIIB	P	P
62	LFP	tubular	I	III	IIA	N	P
63	LSG	CDI	III	II	IIIB	NR	NR
64	LOSM	CDI	III	III	I	P	P
65	LAGR	CDI	III	III	IIIA	P	P
66	LCS	CDI	II	II	IIB	P	P
67	MFS	CDI	III	III	IIA	NR	NR
68	MAG	CDI	II	II	IIA	P	P
69	MABM	CDI	III	II	IIA	N	N
70	MACP	CDI	ign	ign	IV	NR	NR
71	MACS	CDI	III	II	IIB	P	P
72	MAIR	CDI	II	III	IIIA	NR	NR
73	MAJS	CDI	II	II	IIB	P	P
74	MALBB	CDI	III	III	IIA	P	P
75	MAVT	CDI	III	II	IIIB	P	P
76	MAD	lobular	NA	NA	IIB	P	P
77	MAJ	CDI	III	III	IIB	P	P
78	MBRS	ductal+apócrino	ign	ign	IV	NR	NR
79	MCSP	CDI	III	II	IIIB	P	P
80	MCDS	CDI	III	II	IIIB	P	P
81	MGGS	CDI	III	II	IIB	P	P
82	MSP	apócrino	III	III	I	NR	NR
83	MGCS	CDI	II	III	IIIA	P	N
84	MGCB	CDI	III	III	IIB	N	N
85	MGM	CDI	II	II	IIIA	N	P
86	MFTS	CDI	III	II	IIIA	P	P
87	MLFS	CDI	II	II	IIIB	P	P
88	MLZP	CDI	II	II	IIIB	P	P
89	MNC	CDI	III	II	IIIA	N	N
90	MCOS	ductal "in situ"	NA	II	IIIA	P	P
91	MCPL	CDI	III	III	IIIA	N	P
92	MFC	CDI	III	II	IIIB	P	P
93	MHS	CDI	III	II	IIIA	N	N

94	MHSP	CDI	III	III	IIIB	N	N
95	MIS	CDI	III	II	IIIB	P	P
96	MIPC	CDI	III	III	IIA	P	P
97	MIGS	CDI	III	III	IIIA	N	N
98	MJSV	CDI	III	II	IIA	P	N
99	MJPN	CDI	III	II	IIA	P	P
100	MLC	CDI	III	II	IIIB	P	P
101	MLBG	CDI	III	II	IIA	N	P
102	MLCG	CDI	III	II	IIA	P	N
103	MMD	CDI	III	III	IIA	N	P
104	MMB	CDI	III	III	IIIB	N	N
105	MNSF	colóide	I	I	I	P	P
106	MRSM	CDI	III	III	IIA	N	N
107	MSMA	CDI	III	II	NA	NR	NR
108	MTCC	CDI	III	III	IIIB	P	P
109	MVPR	CDI	III	III	I	P	P
110	MRJ	CDI	III	II	IIA	P	P
111	MQ	CDI	III	III	IIIB	N	N
112	MERS	CDI	III	II	I	P	P
113	NEF	CDI	III	II	IIA	P	P
114	NDE	CDI	III	III	IIIB	P	P
115	NASR	CDI	II	III	IIA	P	P
116	NRS	CDI	III	II	IIIB	P	P
117	NRC	CDI	III	III	IIIB	P	P
118	NRP	CDI	III	II	IIIB	P	P
119	RAS	CDI	III	II	IIIB	P	P
120	RMSR	lobular	III	II	I	P	P
121	RTNC	CDI	III	III	IIIB	N	N
122	RNM	CDI	III	III	IIA	P	P
123	RMD	CDI	III	III	IIIB	P	P
124	RAUA	CDI	III	III	IIA	N	N
125	SB	CDI	III	III	IIIA	NR	NR
126	SGA	CDI	III	III	IIIB	N	P
127	SRRN	CDI	III	II	IIIB	P	P
128	SABO	CDI	III	III	IIIB	P	N
129	TTA	CDI	III	III	IIA	N	N
130	TTJ	CDI	III	III	IIA	N	N
131	TJO	CDI	III	III	I	P	N
132	TTR	CDI	III	III	IIA	N	N
133	UG	ductal + colóide	III	III	IIA	N	N
134	VBS	CDI	III	II	IIA	P	P
135	VLSF	CDI	II	III	IIIB	P	P
136	VLVL	CDI	III	II	IIA	P	N
137	VDB	CDI	III	III	I	P	N
138	VNC	CDI	III	III	IIIA	P	P
139	VSG	CDI	III	III	IIIB	N	N
140	ZPD	CDI	III	III	IIIB	N	N
141	AAL	CDI	III	II	IIIB	P	P
142	AFS	CDI	III	II	IIIB	P	N
143	AGR	CDI	III	III	IIIB	P	P
144	AFRB	lobular	NA	NA	I	P	P

145	AGS	CDI	III	II	IIB	P	P
146	COS	CDI	III	III	IIIA	P	P
147	DF	CDI	III	III	IIIA	P	P
148	ISL	CDI	III	II	IIIA	P	P
149	IAD	CDI	III	II	I	P	P
150	LDCA	CDI	III	III	IIA	P	P
151	LSS	CDI	III	II	IIA	P	N
152	MMB	CDI	III	III	NA	N	N
153	MIOC	CDI	III	III	IIA	P	P
154	MJA	apócrino	III	III	IIA	N	N
155	MJFL	CDI	III	II	IV	P	N
156	MSO	CDI	III	III	IIIA	N	N
157	VMON	CDI	III	III	I	N	N
158	ATRB	ductal "in situ"	NA	III	IIIA	NR	NR
159	SRSC	CDI	III	III	IIB	N	N
160	IFNS	apócrino	III	III	I	P	P
161	VEC	tubular	NA	NA	I	NR	NR
162	MTR	CDI	III	III	I	NR	NR
163	AAB	CDI	III	II	I	NR	NR
164	CBN	CDI	II	II	I	P	P
165	MCLS	CDI	III	III	IIB	NR	NR
166	MJCO	CDI	III	III	IIB	NR	NR
167	PZS	CDI	III	III	IIA	N	N
168	BTS	CDI	III	III	IIIA	P	P
169	AJR	neuroendócrino	NA	NA	IIA	P	P
170	ISS	CDI	III	III	IIA	NR	NR
171	MSSG	CDI	III	III	IIIB	NR	NR
172	CCM	CDI	III	III	IIB	NR	NR
173	MAS	CDI	II	II	I	P	P
174	RCOR	CDI	III	III	IIB	P	P
175	EFR	CDI	III	II	I	NR	NR
176	JSSL	CDI	III	III	I	N	N
177	DDP	CDI	II	III	IIB	NR	NR
178	OBR	CDI	III	III	IIB	P	P
179	BVP	CDI	II	II	I	NR	NR
180	SPG	CDI	III	III	IIB	NR	NR
181	SJM	CDI	II	II	IIB	NR	NR

NA= não avaliável; IGN= informação ignorada; tipo histológico: CDI= carcinoma ductal invasivo; grau de diferenciação: I= bem diferenciado; II= moderadamente diferenciado; III= indiferenciado; grau nuclear: I= pouco diferenciado; II= moderadamente diferenciado; III= bem diferenciado; RE= receptor de estrogênio; RP= receptor de progesterona; P= positivo; N= negativo; NR= não realizado

Distribuição das 181 pacientes com câncer de mama esporádico,
de acordo com a identificação do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*
e a concentração da endostatina sérica

Nº do caso	Paciente	D104N	Endostatina (ng/ml)
1	AAS	DD	122,414
2	ANPB	DD	NR
3	ABA	DD	125,512
4	ACCR	DD	90,472
5	AMTS	DD	133,396
6	AADR	NN	NR
7	AMCA	DD	97,546
8	AMOS	DD	NR
9	ASBR	DD	159,796
10	AGLR	DD	92,890
11	ABS	DD	123,054
12	ACB	DD	106,413
13	AAA	DD	NR
14	AAS	DD	101,811
15	AS	DD	129,690
16	AMR	DD	143,987
17	AMB	DD	72,719
18	APS	DD	NR
19	BT	NN	102,510
20	BCV	DD	NR
21	CA	DD	95,723
22	CCOA	NN	86,087
23	DSBSS	DD	NR
24	DFT	DD	107,198
25	DB	DD	107,686
26	DMSN	DD	117,400
27	DSB	DD	100,064
28	DNE	DD	NR
29	DRI	DD	103,933
30	EAR	DD	119,510
31	EAA	DD	59,484
32	EMSS	DD	97,652
33	EPS	DD	68,160
34	ETM	DD	96,907
35	EGC	DD	103,632
36	FPS	DD	35,960
37	FMS	DD	NR
38	GF	DD	NR
39	GAS	DD	59,770
40	HR	DN	98,140
41	HAB	DD	77,630
42	HAML	DD	115,214
43	ISGJ	DN	30,960
44	IOR	DD	NR

45	IGS	DD	80,761
46	IBKA	DD	NR
47	IMA	DD	70,210
48	IBFO	DD	61,418
49	ISA	DN	NR
50	IMF	DD	94,778
51	ICS	DD	132,762
52	IPS	DD	106,708
53	IEL	DD	121,042
54	JMR	DD	83,800
55	JPS	DD	145,500
56	JFSF	DD	NR
57	JMRA	DN	99,231
58	JSC	DD	92,072
59	JSB	DD	NR
60	JACA	DD	164,760
61	JDSC	DD	NR
62	LFP	DD	45,278
63	LSG	DD	125,300
64	LOSM	DD	112,296
65	LAGR	DD	65,557
66	LCS	DD	91,504
67	MFS	DD	121,957
68	MAG	DD	54,722
69	MABM	DD	83,520
70	MACP	DD	NR
71	MACS	DD	110,295
72	MAIR	DD	77,784
73	MAJS	DD	157,420
74	MALBB	DD	NR
75	MAVT	DD	74,040
76	MAD	DD	103,340
77	MAJ	DD	108,560
78	MBRS	DD	NR
79	MCSP	DD	110,199
80	MCDS	DD	NR
81	MGGS	DD	78,225
82	MSP	DN	NR
83	MGCS	DD	NR
84	MGCB	DD	57,470
85	MGM	DN	104,732
86	MFTS	DD	NR
87	MLFS	NN	90,060
88	MLZP	DN	140,677
89	MNC	DD	103,028
90	MCOS	DD	128,868
91	MCPL	DD	112,675
92	MFC	DD	153,664
93	MHS	DD	100,870
94	MHSP	DD	107,906
95	MIS	DD	NR

96	MIPC	DD	NR
97	MIGS	DD	47,089
98	MJSV	DD	193,357
99	MJPN	DD	68,259
100	MLC	DD	102,522
101	MLBG	DD	NR
102	MLCG	DD	57,194
103	MMD	DD	285,943
104	MMB	DD	NR
105	MNSF	DD	116,427
106	MRSM	DD	75,820
107	MSMA	DD	103,833
108	MTCC	DD	112,486
109	MVPR	DD	119,112
110	MRJ	DD	122,597
111	MQ	DD	NR
112	MERS	DD	95,831
113	NEF	DD	69,360
114	NDE	DD	74,290
115	NASR	DN	90,703
116	NRS	DD	123,965
117	NRC	DD	115,308
118	NRP	DD	42,820
119	RAS	DD	119,020
120	RMSR	DD	98,603
121	RTNC	DD	NR
122	RNM	DD	NR
123	RMD	DD	112,675
124	RAUA	DD	111,536
125	SB	DD	139,031
126	SGA	DD	66,841
127	SRRN	DD	NR
128	SABO	DD	33,910
129	TTA	DD	106,904
130	TTJ	DD	151,300
131	TJO	DD	NR
132	TTR	DD	87,406
133	UG	DD	NR
134	VBS	DD	105,229
135	VLSF	NN	126,120
136	VLVL	DD	118,835
137	VDB	DN	93,640
138	VNC	DD	417,330
139	VSG	DD	NR
140	ZPD	DD	100,167
141	AAL	DD	NR
142	AFS	DD	117,170
143	AGR	DD	104,440
144	AFRB	DD	113,431
145	AGS	DN	161,686
146	COS	DD	107,393

147	DF	DD	103,532
148	ISL	DD	NR
149	IAD	DD	115,775
150	LDCA	DD	NR
151	LSS	DD	94,778
152	MMB	DN	NR
153	MIOC	DN	48,064
154	MJA	DN	109,526
155	MJFL	DD	113,361
156	MSO	DD	138,848
157	VMON	DD	NR
158	ATRB	DD	NR
159	SRSC	DD	NR
160	IFNS	DD	NR
161	VEC	DD	NR
162	MTR	DD	NR
163	AAB	DN	NR
164	CBN	DD	NR
165	MCLS	DD	NR
166	MJCO	DD	NR
167	PZS	DD	NR
168	BTS	DN	NR
169	AJR	DD	NR
170	ISS	DD	NR
171	MSSG	DD	NR
172	CCM	DD	NR
173	MAS	DD	NR
174	RCOR	DD	NR
175	EFR	DD	NR
176	JSSL	DD	NR
177	DDP	DD	NR
178	OBR	DD	NR
179	BVP	DD	NR
180	SPG	DD	NR
181	SJM	DD	NR

DD= indivíduos com alelos selvagens; DN= indivíduos com o polimorfismo em heterozigose; NN=, indivíduos com o polimorfismo em homozigose