



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Processos
Interativos dos Órgãos e Sistemas**

PAULA BRITO CORRÊA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO E ANCESTRALIDADE AFRICANA**

SALVADOR
2010

PAULA BRITO CORRÊA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO E ANCESTRALIDADE AFRICANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Dra. Ivana Lucia Nascimento
Co-orientadoras: Prof^ª. Dra. Maria Betania
Toralles e Prof^ª. Dra. Kiyoko Abe-Sandes

SALVADOR
2010

C824

Corrêa, Paula Brito.

Associação entre câncer de mama triplo-negativo e ancestralidade africana./ Paula Brito Corrêa. 2010. 63f.

Orientador(a): Prof. Dra. Ivana Lucia Nascimento.

Co-orientadoras: Prof^{as}. Dra. Maria Betania Toralles e Prof^a Dra Kiyoko Abe-Sandes.

Dissertação(mestrado)- Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2010.

1. Cancêr - mama. 2. Ancestralidade africana. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Ivana Lucia Nascimento. III. Maria Betania Toralles. IV. Abe-Sandes, Kiyoko. V. Título.

CDU: 616-006.6

PAULA BRITO CORRÊA

ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO E ANCESTRALIDADE AFRICANA

Dissertação apresentada à banca de defesa como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas pelo Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA:

BANCA DE DEFESA

Prof^a. Dra. Maria Betânia Pereira Toralles _____
Doutora em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia,
Salvador, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dra. Kiyoko Abe Sandes _____
Doutora em Ciências Biológicas (Genética) pela Universidade de São Paulo,
Ribeirão Preto, Brasil
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Prof^a. Dra. Gabriela Botelho Martins _____
Doutora em Odontologia (Estomatologia Clínica) pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Aos pacientes com câncer,
Que compreendem o estudo e cooperaram conosco.

AGRADECIMENTOS

Faço um agradecimento especial à minha orientadora Prof^ª. Dra Ivana Nascimento e co-orientadoras Prof^ª. Dra. Kiyoko Abe-Sandes e Prof^ª. Dra Betânia Toralles pela paciência, compreensão e disponibilidade de me orientarem nesse trabalho cheio de percalços e obstáculos.

Não posso deixar de esquecer das doutorandas Taísa Manoela e Thaís Bonfim por estarem tão disponíveis em me ajudar. Assim como as acadêmicas Lorena Meyer e Camila Abe-Sandes. Sem a colaboração e apoio delas nada disso seria possível.

Não posso deixar de agradecer ao Prof. Roberto Paulo por me elucidar na resolução de problemas e por me dar uma oportunidade fundamental de crescimento acadêmico.

À Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, da UFBA, pelo apoio, a infra-estrutura, a qualidade e a simpatia dos seus professores, pesquisadores e funcionários.

À Silvia Letícia Melo e à Selma São Bernardo, técnicas do laboratório de oncogenética do Instituto de Ciências da Saúde (UFBA), por darem todo o suporte na parte técnica e laboratorial da pesquisa.

Às citogeneticistas, Mônica Jacobina e Esmeralda Alves, por darem todo o apoio psicológico e moral na conclusão deste trabalho. À bibliotecária Sônia na ajuda com a normatização.

À Neto e família por não permitirem que eu tomasse decisões erradas.

E, sobretudo às pacientes com câncer que, além de contribuírem com a realização da pesquisa, tornaram-se uma inspiração para toda vida.

CORRÊA, Paula Brito. **Associação Entre Câncer de Mama Triplo-Negativo e Ancestralidade Africana**. 63f. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2010.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Câncer de mama triplo-negativo é um termo recente e refere-se a tumores que, quando analisados por imunohistoquímica, não expressam receptores de estrógeno, progesterona e HER2. O fenótipo triplo negativo (TN) possui características patológicas e clínicas bastante diferentes dos demais subtipos de câncer de mama, apesar de apresentarem similaridades entre os cânceres do tipo basal e os que ocorrem em pacientes com mutações no gene BRCA1. Além dessas características, estes tumores afetam mais frequentemente mulheres com menos de 50 anos, possuem comportamento mais agressivo, apresentam resposta pobre aos protocolos de tratamento existentes e são mais prevalentes entre as Afro-Americanas (AA). O resultado desta observação tem levado a questões sobre a natureza das diferenças “raciais”, geográficas ou étnicas em relação à prevalência da doença ou traços relacionados à doença. As razões dessa associação entre o fenótipo triplo negativo e a ancestralidade africana ainda não estão claras, por isso torna-se necessário conhecê-las de modo a oferecer uma melhor prevenção e terapia a estas pacientes. **OBJETIVO:** O objetivo desse estudo foi analisar a ancestralidade e as características clínicas e histopatológicas de uma amostra de pacientes de alto risco para câncer de mama e ovário hereditário do Serviço de Oncogenética da Universidade Federal da Bahia (UFBA). **METODOLOGIA:** Foram analisados 119 prontuários de pacientes encaminhados ao Ambulatório de Oncogenética, destes apenas 75 fizeram estudos moleculares para marcadores informativos de ancestralidade (AIMs). **RESULTADOS:** Apenas 10% dos pacientes que entraram nos critérios de inclusão apresentaram o carcinoma TN. Fenotipicamente, a afrodescendência em pacientes TN foi maior (62.5%, $P < 0.05$). Já na análise genômica, de acordo com a estimativa de mistura populacional feita através dos AIMs, a maior contribuição ancestral para as pacientes TN foi a africana (50%), seguida da europeia (40%) e por último a ameríndia (8%). Quando se comparou a mistura populacional dos grupos de receptores TN e R+ (receptores hormonais e HER2 positivos) não houve diferenças estatisticamente significante ($P=0.218$). Embora o número de pacientes avaliados deva ser considerado. **CONCLUSÃO:** Ao contrário do que foi visto na literatura, até o momento a associação do fenótipo triplo-negativo com a ancestralidade africana não foi evidenciada com o uso de marcadores moleculares biparentais (AIMs), provavelmente devido ao baixo número amostral da população estudada. Por isso, mais pesquisas são necessárias para identificar as diferenças existentes na sobrevivência entre pacientes caucasianas e afrodescendentes com câncer de mama.

PALAVRAS CHAVES: Câncer de mama, Triplo negativo, Ancestralidade africana.

CORRÊA, Paula Brito. **Associations Between Breast Cancer Triple Negative and African Ancestry**. 63f. 2010. Máster Dissertation - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2010.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Triple negative breast cancer is a recent term and refers to tumors that, when analyzed by immunohistochemistry do not express estrogen, progesterone and HER2 receptors. The phenotype of triple negative (TN) has clinical and pathological features quite different from other subtypes of breast cancer, despite showing similarities between basal-type cancers and those occurring in patients with BRCA1 gene mutations. Besides these features, these tumors most often affect women under 50 years, have more aggressive behavior, have poor response to existing treatment protocols and are more prevalent among African-Americans (AA). This observation has led to questions about the nature of "racial" differences, geographic or ethnic issues regarding the prevalence of the disease or disease-related traits. The reasons for this association between triple negative phenotype and African ancestry are not clear, so more studies are necessary to understand them better and so provide better prevention and therapy approaches for these patients. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the association between ancestry and clinical and histopathological features of a sample of patients with breast cancer at high risk of for carrying gene mutations in Oncogenetics Clinics, University Federal of Bahia (UFBA). **METHODS:** We reviewed 119 cases of patients referred to Oncogenetics Clinics. Seventy-five of them underwent molecular studies of ancestry informative markers (AIMs). **RESULTS:** Only 10% of eligible patients had TN carcinoma. Phenotypically, the African background had higher incidence in patients with TN (62.5%, $P < 0.05$). In the genomic analysis, according to the estimated population mix made through the AIMs, the largest contribution to the ancestor was African TN patients (50%), followed by European (40%) and lastly the Amerindian (8%). When the 2 groups were compared (TN patients versus hormone receptor and HER2-positive), the difference was not statistically significant ($P = 0.218$). Yet, the small number of patients should be considered. **CONCLUSION:** Contrary to what was seen in the literature, the combination of triple-negative phenotype with African ancestry was not seen with the use of biparental molecular markers (AIMs) so far, probably due to the possible mixing of the population studied. Therefore, more research is needed to identify differences in survival between Caucasian and African descent patients with breast cancer. Although a genetic contribution that should be considered (BRCA gene mutations), socioeconomic factors should be taken into account, requiring a case-control study to compare clinical and histological data between patients with breast cancer from different social classes and racial groups.

KEY WORDS: Breast Cancer, Triple Negative, African Ancestry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação Esquemática da Mama.....	14
Figura 2	Câncer de mama não invasivo e invasivo.....	15
Figura 3	Representação esquemática do PCR em tempo real.....	32
Figura 4	Agrupamento dos indivíduos TN (círculos amarelos), de acordo com a contribuição dos grupos parentais: europeus (círculos vermelhos), africanos (círculos azuis) e nativos americanos (círculos verdes).....	44
Gráfico 1	Ancestralidade referida dos pacientes com câncer de mama.....	36
Gráfico 2	Ancestralidade referida dos pacientes TN.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Loci</i> , tipo de polimorfismo analisado, localização cromossômica, população onde o alelo *1 é mais freqüente e seqüência dos primers	29
Tabela 2	Componentes da mistura da reação de PCR.....	30
Tabela 3	Descrição do programa utilizado no termociclador.....	30
Tabela 4	Primers utilizados na reação de PCR.....	31
Tabela 5	Freqüências do Alelo*1 dos 8 AIMS analisados nas populações parentais.....	34
Tabela 6	Freqüência racial fenotípica em pacientes com câncer de mama.....	35
Tabela 7	Distribuição da freqüência racial fenotípica em pacientes com câncer de mama de acordo com a imunohistoquímica.....	36
Tabela 8	Comparação de dados clínicos entre os subgrupos de receptores TN e R+.....	38
Tabela 9	Comparação de dados histopatológicos entre os subgrupos de receptores TN e R+.....	39
Tabela 10	Comparação do tipo de tratamento entre os subgrupos de receptores TN e R+.....	40
Tabela 11	Comparação de dados clínicos entre pacientes AD e brancas (B).....	41
Tabela 12	Comparação de dados histopatológicos entre pacientes AD e brancas (B).....	42
Tabela 13	Comparação do tipo de tratamento entre pacientes AD e brancas (B)	42
Tabela 14	Freqüências alélicas dos pacientes TN, R+ e da população total.....	43
Tabela 15	Estimativa de mistura entre pacientes TN e R+.....	44
Tabela 16	Probabilidades obtidas com o teste exato para a verificação da aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras analisadas	45
Tabela 17	Probabilidades obtidas com o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para verificar o déficit de heterozigotos.....	45
Tabela 18	Freqüência do fenótipo TN entre CA e AD em populações dos Estados Unidos (EUA) e Inglaterra.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Cancer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TN	Triplo-negativo
AA	Afro-Americanas
EUA	Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AIMs	Marcadores informativos de ancestralidade
COM-HUPES/UFBA	Complexo Hospital Universitário Edgard Santos / Universidade Federal da Bahia
ICS/UFBA	Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia
FTC	Faculdade de Ciências e Tecnologia
TLCE	Termo Livre de Consentimento Esclarecido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PSA	Persulfato de amônia
CG	Citocina/ Guanina
SNP	Polimorfismos de único nucleotídeo
FY-null	Antígenos Duffy
LPL	Lipoproteína lípase
CKMM	Creatina cinase MM
VIC	Repórter Verde
FAM	Repórter Vermelho
AD	Afrodescendentes
B	Branças
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
HER-2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
BRCA	Breast Câncer
CK	Citoqueratinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	14
2.1.1	Considerações Gerais do Câncer de Mama.....	14
2.2	FENÓTIPO TRIPLO NEGATIVO.....	17
2.3	DIFERENÇA RACIAL NO CÂNCER DE MAMA.....	18
2.4	CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E ANCESTRALIDADE AFRICANA.....	19
2.5	ANCESTRALIDADE.....	22
2.5.1	População Brasileira.....	22
2.5.2	Marcadores de Ancestralidade.....	23
2.6	AMBULATÓRIO DE ONCOGENÉTICA.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	GERAL.....	26
3.2	ESPECÍFICOS.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	DELINEAMENTO.....	27
4.2	AMOSTRA.....	27
4.2.1	Crítérios de inclusão.....	27
4.2.2	Crítérios de exclusão.....	28
4.3	OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	29
4.4	ANCESTRALIDADE FENOTÍPICA E ANCESTRALIDADE REFERIDA.....	29
4.5	AMBULATÓRIO DE ONCOGENÉTICA.....	29
4.6	ANÁLISE MOLECULAR.....	30
4.6.1	Extração de DNA.....	28
4.6.2	Ancestralidade por marcadores biparentais.....	29
4.6.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
4.6.4	PCR seguido de RFLP.....	31
4.6.5	PCR em tempo real.....	31
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4.7.1	Frequências Alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	33
4.7.2	Mistura Genética.....	35
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Câncer de mama é o tipo mais comum de câncer nas mulheres em todo o mundo, excluindo o câncer de pele não melanoma. É uma neoplasia maligna que possui várias características: tem alta prevalência no mundo ocidental, relaciona-se à produção de hormônios sexuais, tem sido associada à obesidade e parece ter uma pior evolução em determinados grupos raciais, principalmente em afrodescendentes.

A partir dos dados imunohistoquímicos, o câncer de mama é classificado em três grupos principais: os tumores com receptores hormonais positivos; os que têm expressão aumentada de HER-2 (human epidermal growth – type 2) e os que não expressam receptor de estrógeno ou de progesterona nem HER-2, e são denominados triplo-negativos (TN). Estas moléculas funcionam como marcadores tumorais de valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento.

Alguns estudos sugerem que além dos fatores socioeconômicos, uma grande proporção de mulheres afrodescendentes (AD) tem um prognóstico ruim devido a fatores moleculares como, por exemplo, o fenótipo TN.

Estudos moleculares de ancestralidade devem ser feitos para explicar essas diferenças, correlacionando-as com a sobrevida, e propondo novos alvos terapêuticos. Estas associações podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica em mulheres AD com o fenótipo triplo negativo.

No presente estudo, utilizando-se marcadores moleculares biparentais (marcadores informativos de ancestralidade - AIMS), foi estimada a contribuição africana, européia e ameríndia em pacientes com diagnóstico de câncer de mama em uma população alto risco para câncer hereditário do Serviço de Oncogenética da Universidade Federal da Bahia, com o objetivo de verificar se é possível a associação do fenótipo TN com a ancestralidade africana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

2.1.1 Considerações Gerais sobre o Câncer de Mama

As mamas são glândulas exócrinas e sua função principal é a produção de leite. São compostas de lobos que se dividem em porções menores, os lóbulos, e ductos, que conduzem o leite produzido para fora pelo mamilo, (figura 1). Como todos os outros órgãos do corpo humano, também se encontram nas mamas vasos sanguíneos e linfáticos. Estes últimos drenam a linfa para os gânglios linfáticos, ou linfonodos. Os vasos linfáticos das mamas drenam para os linfonodos das axilas, região do pescoço e tórax (GUYTON ; HALL, 2006).

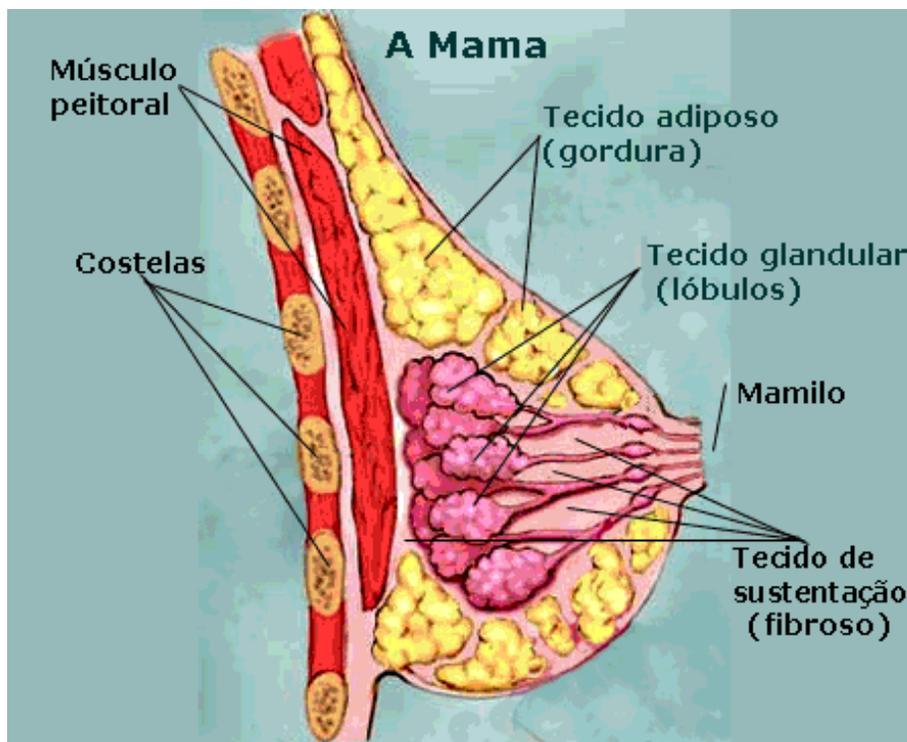


FIGURA 1 – Representação esquemática da Mama.
Fonte: http://www.drcarlos.med.br/mama_1.gif

O Câncer de Mama, segundo definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma neoplasia maligna do tecido mamário. As células deste tecido passam a se dividir e se reproduzir rapidamente e de forma desordenada. A maioria dos cânceres

de mama acomete as células dos ductos. Por isso, o tipo histológico mais comum é o Carcinoma Ductal. Ele pode ser *in situ*, quando não passa das primeiras camadas de célula destes ductos, ou invasor, quando ultrapassa a lâmina basal do epitélio ductal e invade os tecidos vizinhos (figura 2). Os cânceres que começam nos lóbulos da mama são chamados de Carcinoma Lobular, são menos comuns que o primeiro e freqüentemente acomete as duas mamas. O Carcinoma Inflamatório de mama é mais raro e normalmente se apresenta de forma agressiva, comprometendo toda a mama, deixando-a vermelha, inchada e quente (ROBBINS;COTRAN, 2008).

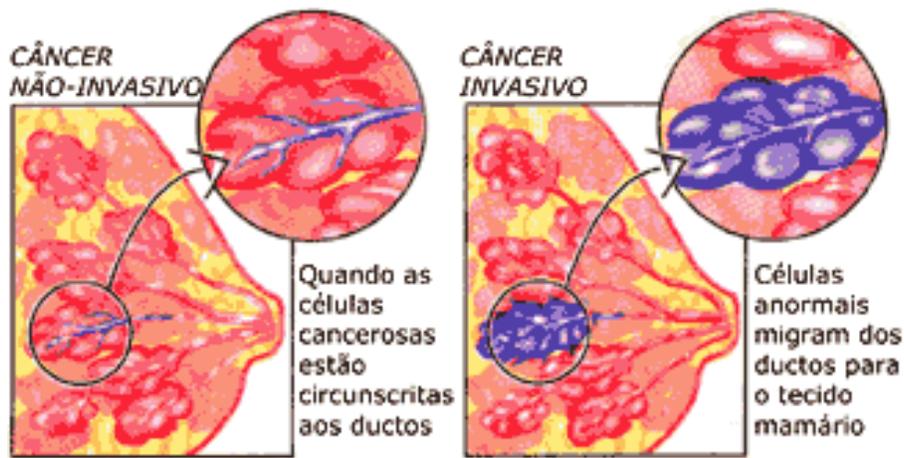


FIGURA 2 – Câncer de mama não invasivo e invasivo
 Fonte : www.mayoclinic.com/health/medical/IM03011 (ADAPTADO)

Vários fatores ambientais como a obesidade, o tabagismo e o uso de anticoncepcionais foram associados ao câncer de mama.

A neoplasia maligna da mama tem uma alta prevalência no mundo ocidental, está ligada à produção de hormônios sexuais e parece ter uma pior evolução em determinados grupos étnicos, principalmente em afrodescendentes – AD (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007).

Em valores absolutos, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. As estatísticas indicam o aumento de sua freqüência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (International Agency for Research on Cancer). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de

incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes.

No Brasil, esse tipo de câncer é o de maior incidência na população feminina, quando se exclui o câncer de pele não melanoma, com o número de casos novos de câncer de mama, em 2008, de 49.400, e com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na Bahia, a estimativa de incidência para o câncer de mama em 2008 foi de 24,92/100.000 mulheres (INCA, 2009).

O AJCC (American Joint Committee on Cancer) estabelece uma classificação histológica de acordo com estadiamento do câncer. O estadiamento é uma estimativa da extensão de penetração do câncer. É feito por razões de diagnose e pesquisa, e para determinar o melhor método de tratamento. Os sistemas para avaliar carcinomas dependem da extensão da invasão local, do grau de invasão de nódulos linfáticos, e da presença de metástases distantes. A AJCC desenvolveu o sistema de estagiamento mais comum: a classificação TNM (para tumores, nódulos e metástases). O sistema TNM possui três categorias, cada uma com números indicando a severidade da extensão do tumor. "T" denota o grau de invasão, "N" o grau de envolvimento de nódulos linfáticos, e "M" a presença de metástases. Estágios são geralmente descritos em numerais romanos (I, II, III, IV). Um número maior indica câncer mais avançado, e pior prognóstico.

O comportamento biológico, prognóstico e evolução do câncer de mama são extremamente variáveis o que vem sendo confirmado por estudos moleculares.

O estudo imunohistoquímico do tumor da mama tem como o objetivo principal obter informações sobre a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), do receptor do fator de crescimento epidérmico (HER-2), da proteína p53 mutada e do marcador Ki67 pelas células neoplásicas. Estas moléculas funcionam como marcadores tumorais de valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento (PEROU et al., 2000).

O prognóstico e as implicações terapêuticas da expressão desses marcadores já estão bem estabelecidos. Até 75% dos carcinomas da mama expressam receptores de estrógeno e cerca de 50% co-expressam receptores de progesterona. A expressão aumentada de HER-2 aparece em cerca de 30% destes tumores e aproximadamente 20%

não expressam estes receptores e são denominados de triplo-negativos (HANLEY et al, 2009).

A proteína nuclear p53 é o produto do gene supressor de tumor TP53 e, quando ativada, é responsável pela resposta celular a danos no DNA. Esta proteína só é detectada por imunohistoquímica se estiver inativada. O valor prognóstico deste marcador não está bem estabelecido, mas parece estar associado à evolução pior quando presente em tumores triplo-negativos (CHAE et al, 2009). Ki67 é um marcador bem estabelecido de proliferação celular em câncer de mama. Metanálises recentes relataram que existe uma associação significativa entre câncer de mama e risco de recidiva e morte com este marcador (MAGGIE et al, 2009).

Cerca de 5% do total de casos de câncer de mama estão associados a mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2. Na medida em que estas mutações são transmissíveis por herança mendeliana clássica, as portadoras destas mutações frequentemente apresentam famílias com diversos casos de câncer de mama que ocorrem em gerações consecutivas (HAFFTY et al., 2009; SHARON et al., 1998).

2.2 FENÓTIPO TRIPLO NEGATIVO

De acordo com estudos imunohistoquímicos pacientes com câncer de mama integram três grupos principais: aqueles com receptores hormonais positivos; aqueles com HER2 positivo e, os triplos negativos. Com o avanço dos estudos genéticos, foi possível, através da técnica de microarranjos, reclassificar esses subtipos moleculares em cinco grandes grupos: dois com receptores hormonais positivos (luminal A e B); e três com receptores hormonais negativos, dos quais um grupo apresenta o HER2 positivo, outro chamado de tipo normal e o outro grupo chamado de carcinoma basal (SORLIE et al., 2001 ; 2003).

Câncer de mama triplo-negativo (TN) é um termo recente e refere-se a tumores que, quando analisados por imunohistoquímica, não expressam receptores de estrógeno, progesterona e HER2, e constitui aproximadamente 15% de todos os cânceres de mama invasivos (STEAD et al., 2009; CLEATOR et al, 2007). Suas características moleculares e clínicas se superpõem às dos tumores definidos, pela técnica de microarranjos, como do tipo basal. Além dessas características, estes tumores afetam mais frequentemente mulheres com menos de 50 anos, apresentam comportamento mais

agressivo e são mais prevalentes entre as Afro-Americanas (AA) (REIS-FILHO ; TUTT, 2008).

Frequentemente apresenta características que ilustram uma similaridade entre o câncer do tipo basal como, por exemplo, ser mais freqüente em pacientes jovens; ser um tumor mais agressivo e com sobrevida menor do que em outros subtipos moleculares; estar associado a mutações nos genes BRCA1; e ser mais prevalente entre AD (CAREY et al., 2006; TRIVERS et al., 2009; LUND et al., 2008; STARK et al., 2010). Além destas semelhanças estes tumores apresentam freqüentemente mutação de TP53 que prediz resposta aos taxanos, não mostrando sensibilidade maior a este grupo de drogas em modelos experimentais (CHABALIER et al, 2006; ROTTENBERG et al, 2007).

Segundo Nielsen *et al.* (2004), os tumores basais diferem dos triplos negativos porque usualmente expressam moléculas de alto peso molecular freqüentemente encontradas no epitélio de células basais, as citoqueratinas (CK; CK5/6, CK14 e CK17). Além disso, estudos genéticos sugerem que o fenótipo TN também aparece em outro subgrupo molecular, o tipo normal. Este carcinoma difere do subgrupo basal porque apresenta um melhor prognóstico, apesar de também não responder a terapia neoadjuvante (MILLIKAN et al., 2003; VAN DE RIJN et al., 1996).

2.3 DIFERENÇA RACIAL NO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres, mas é a principal causa em mulheres AA (JEMAL et al., 2004). Por muitas décadas, tem-se observado uma relação paradoxal em mulheres AA com câncer de mama, o índice de morte por câncer de mama é alto, apesar da baixa incidência no diagnóstico deste câncer comparada com mulheres caucasianas. Mulheres AA com câncer de mama têm um risco de morte 67% maior quando comparada com mulheres caucasianas (NEWMAN, 2004). Além disso, em 2000 Joslyn et al. observaram uma proporção maior de mulheres AA jovens com câncer de mama comparada com mulheres caucasianas, sendo 33% das mulheres AA com idade inferior a 50 anos x 25% das mulheres caucasianas.

Foi observado também que o câncer de mama invasivo é o tipo mais comum de câncer em mulheres em todos os grupos raciais, mas nas mulheres AA com diagnóstico de câncer de mama esse tipo de câncer parece ser mais agressivo. A incidência de mulheres AA com carcinoma tubular ou lobular é baixa comparada com mulheres

caucasianas, pois é mais comum essas mulheres apresentarem patologias de câncer de mama mais agressivas, como o carcinoma medular ou inflamatório (JOSLYN et al., 2000).

Além disso, vários estudos têm confirmado que mulheres AA não somente são mais diagnosticadas nos estágios tardios da doença, como também apresentam tumor de alto grau, possuindo, por isso, um comportamento mais agressivo (ADEMUYIWA et al., 2003; LI et al., 2004; WINER et al., 2005). O diagnóstico tardio ocorre devido a fatores socioeconômicos. Segundo Janz et al. (2008) mulheres AA recebem menos informações e suportes necessários ao tratamento do câncer de mama.

Vários estudos demonstram que mulheres AA possuem alta incidência de marcadores imunohistoquímicos negativos (receptores hormonais e receptor do fator de crescimento epidérmico) (MORRIS et al., 2007; LUND et al., 2010; LUND et al., 2008; STEAD et al., 2009), que estão associados com um mau prognóstico, além de apresentarem alta expressão do Ki-67 (MORRIS et al., 2007).

Múltiplos fatores podem estar associados a essa diferença racial encontrada em mulheres com câncer de mama. Morris et al. (2007) acreditam que o atraso no diagnóstico nas mulheres AA pode interferir no prognóstico, além do aumento na massa corporal, a alimentação, obesidade e o alto índice de gravidez precoce, que levam ao aumento da duração de estrogênio na circulação sanguínea, aumentando o risco de desenvolver câncer de mama.

O tratamento do câncer de mama também tem um diferencial em mulheres AA. Um recente estudo mostrou que o excesso de barreiras socioeconômicas leva a freqüente modificação na administração da quimioterapia adjuvante em pacientes AA (SMITH et al., 2005). Hershman et al. (2005) demonstraram que pacientes AA recebem menos ciclos do tratamento proposto, terminando precocemente o tratamento, o que acarreta uma sobrevida menor quando comparadas com aquelas com tratamento completo. Vale salientar que esses estudos foram feitos em países onde a diferença racial e social caminham juntas.

2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E ANCESTRALIDADE AFRICANA

Vários autores demonstraram que fenótipo triplo negativo tem maior incidência em pacientes AA (STEAD et al., 2009; REIS-FILHO ; TUTT, 2008; TRIVERS et al., 2009; LUND et al., 2008). Um dos primeiros estudos que associaram pacientes AA e o

fenótipo triplo negativo foi o realizado na Carolina do Norte, EUA, que observou maior incidência do câncer de mama triplo negativo em mulheres de origem AA predominantemente na pré-menopausa (CAREY et al., 2006). Outro estudo realizado com 148 pacientes Nigerianas com câncer de mama mostrou que 66,9% destas pacientes estavam na pré-menopausa, apenas 22% dos tumores expressavam receptores hormonais e 19% tinham superexpressão de HER2. Mais da metade destas pacientes tinha tumor de mama do tipo basal (OLOPADE et al, ASCO Meeting 2004 Abstract 9509).

Morris et al. avaliaram 197 pacientes AA com câncer de mama e 274 pacientes caucasianas, entre 1990 e 2000, do National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER); e 2230 pacientes AA e caucasianas do Thomas Jefferson University Hospital, entre 1995 e 2002. Pacientes AA com câncer de mama, em ambos os levantamentos, além de apresentarem maior incidência do fenótipo TN, apresentam também tumores em estágio tardio e de alto grau e aumento na expressão do receptor Ki 67, que é um marcador bem estabelecido de proliferação celular em câncer de mama. Possuem também alta incidência da proteína nuclear p53, que é o produto do gene supressor de tumor TP53 e, quando ativada, é responsável pela resposta celular a danos no DNA. Esta proteína só é detectada por imunohistoquímica se estiver inativada.

Segundo Lund et al., 2009, na avaliação de 160 pacientes AA e 360 pacientes caucasianas (CA) em Atlanta, EUA, com idade entre 20 e 54 anos, foi observado alta prevalência de TN em mulheres AA jovens. Os autores sugerem que pacientes AA apresentam algum fator genético que aumenta o risco de desenvolver o fenótipo TN.

Um grupo de autores britânicos avaliou mulheres negras e brancas com câncer de mama e de mesmo *status* social. Os tumores em mulheres jovens foram considerados mais agressivos na população negra, com risco de TN negativo em mulheres negras e jovens foi maior do que em mulheres brancas. Este estudo apresentou os mesmos resultados que os realizados em AA, tendo como diferença entre eles o fato dos pacientes britânicos terem recebido o mesmo tipo de tratamento (BOWEN et al., 2008).

Os mesmos resultados foram encontrados por Lund et al., 2008, em Atlanta, Geórgia, EUA. O fenótipo TN também foi associado a pacientes jovens e AA. Assim, como o estudo britânico as pacientes analisadas apresentavam o mesmo status social,

recebendo o mesmo tipo de tratamento, com o mesmo número de ciclos. O fenótipo TN foi encontrado em 30% nas pacientes AA comparado com 13% nas pacientes sem ascendência africana.

Diferentemente de outros autores, Stead et al., em Boston (2009), observaram que o fenótipo TN também acometia mais mulheres AA que caucasianas, mas sem relação com a idade. Tumores TNs foram igualmente comuns tanto em mulheres jovens, abaixo de 50 anos, como em mulheres acima de 50 anos (29% x 31%).

Em 2009, Trivers et al., além de associar o fenótipo TN à mulheres jovens AA, observou que a idade reprodutiva mais precoce e o excesso de peso eram maior nessas pacientes.

Estudos revelaram que o fenótipo triplo negativo do câncer de mama em pacientes AA contribui para o aumento da mortalidade. Apesar do risco de morte também estar associado a fatores socioeconômicos. Mulheres AA têm menor acesso ao diagnóstico precoce e menor período no tratamento (MORAN et al., 2008; PATEL et al., 2010).

Os resultados destas observações têm levado à questões sobre a natureza das diferenças raciais, geográficas ou étnicas em relação à prevalência de doenças ou traços relacionados às doenças. Esta diversidade biológica, associação ou não à doença, já vem sendo estudada utilizando diferentes abordagens em diversas populações (SHRIVER, 1997).

2.5 ANCESTRALIDADE

2.5.1 População Brasileira

A população brasileira, antes de 1500, era composta principalmente por vários povos indígenas que se distribuíam ao longo da Costa. Com a chegada dos europeus e africanos houve a miscigenação desses povos, dando origem à população brasileira atual (CALLEGARI-JACQUES e SALZANO, 1999).

Com a colonização do Brasil pelos portugueses ocorreu uma diminuição drástica da população indígena, e, posteriormente, pela necessidade de mão de obra (trabalho escravo), um aumento da população africana.

Os africanos trazidos para o Brasil vieram de diversas regiões da África, ocidente, oriente e sudoeste, sendo que a maioria originou-se das regiões dos atuais países, Congo e Angola (KLEIN, 2002). Salvador, Recife e Rio de Janeiro constituíam, na época, os principais destinos dos africanos que foram trazidos para o Brasil (GATTÁS et al. 2004).

No início do século XIX, os negros constituíam 47% da população brasileira, contra 30% de mulatos e 23% de brancos (IBGE, 2000). Essa composição foi profundamente alterada por fatores como, por exemplo, a proibição do tráfico de escravos (1850), a elevada mortalidade da população negra, o forte estímulo à imigração europeia (expansão cafeeira), além da intensa miscigenação entre brancos e negros. E no final do século XIX, os negros estavam reduzidos a 20% da população, contra 42% de mulatos e 38% de brancos (IBGE, 2000).

Com o fim do trabalho escravo, outros povos começaram a migrar para o Brasil, como italianos, espanhóis, alemães, japoneses e chineses, juntando-se aos grupos já existentes (africanos ameríndios e portugueses). Assim, esses povos formaram a atual população brasileira que é caracterizada por grande diversidade genética e miscigenação intensa (CALLEGARI-JACQUES e SALZANO, 1999).

Por ser uma das primeiras áreas de colonização, a Bahia, assim como o Brasil, possui uma população altamente heterogênea, baseada em três grupos principais: ameríndios, africanos e europeus (TAVARES, 2001). Segundo Gattás et al. (2004), 75% da população baiana é constituída por afrodescendentes, caracterizando, assim, uma das populações que melhor representa esse grupo racial fora da África.

2.5.2 MARCADORES DE ANCESTRALIDADE

Cavalli-Sforza e Bodmer, 1971, demonstraram que a frequência de algumas variantes genéticas é diferente entre populações e ou regiões geográficas distintas. Aqueles variantes cujo diferencial de frequência alélica entre populações distintas étnica ou geográfica é maior que 30%, foram denominados alelos específicos de população (PSAs) (SHRIVER, 1997). Estes polimorfismos são atualmente conhecidos como marcadores informativos de ancestralidade (AIMs). A análise destes marcadores é importante para descrição da diversidade genética populacional, reconstrução histórica

dos povoamentos (CALLEGARI-JACQUES & SALZANO, 1999; YANAGIHARA et al., 1995), estimativa de contribuição das populações ancestrais na formação de populações miscigenadas (SHRIVER et al., 1997; SHRIVER et al., 2003; PARRA et al., 1998; PARRA et al., 2001), estudos de mapeamento genético e associação com doenças (SHRIVER, 1997).

As análises da diversidade genética e estimativa de mistura genética podem ser realizadas avaliando-se marcadores uniparentais (cromossomo Y e DNA mitocondrial – DNAMt) ou marcadores biparentais. O uso de marcadores uniparentais é importante para estimativa da contribuição parental (materna ou paterna) isolada, e assim detectar diferenças de contribuições, masculina e feminina, na formação de uma população.

As primeiras análises sobre a diversidade biológica humana foram feitas utilizando características morfológicas (COON, 1965); em seguida utilizando-se variantes protéicos (HARRIS; HOPKINSON, 1972) e atualmente são utilizados preferencialmente os variantes de DNA. Os avanços na área da Biologia Molecular permitiram o acesso ao nível hierárquico primário da informação genética e revelaram uma grande diversidade molecular da nossa espécie.

Análises de estimativa de mistura já foram realizadas em diversas populações mundiais incluindo a população brasileira. Como exemplo temos o trabalho de Ferreira et al.(2006) que fez a estimativa de mistura genética em uma amostra da população de São Paulo e mostraram que esta população, tem europeus, africanos e ameríndios como populações parentais, e a contribuição de cada população foi de 79%, 14% e 7%, respectivamente. Muniz et al., 2008 mostrou em afro-brasileiros a contribuição ancestral de 62%, 26% e 12% de europeus, africanos e ameríndios. O estudo do DNAMt em amostras de brasileiros classificados como brancos do estado do Rio Grande do Sul confirmou a marcante heterogeneidade da população brasileira, revelando a presença de 36% de contribuição nativo americana e 16% africana (MARRERO et al., 2005).

Com relação à população da Bahia, dados do IBGE, baseados na autodenominação de raça/cor, mostram que esta população é composta por 77,5% de afrodescendentes e que, em Salvador, o percentual de pretos e pardos é de 79,8%. Grande parte dos dados sobre diversidade genética da população da Bahia foi produzida com análise de variantes protéicos (AZEVEDO et al., 1986).

A avaliação dessa diversidade com marcadores moleculares foi realizada principalmente em remanescentes de quilombos (ABÉ-SANDES et al., 2004; BARBOSA et al., 2006). A análise de 10 AIMs em uma amostra de 1286 indivíduos de Salvador revelou que a contribuição africana individual variou de 13% a 68,5% (MACHADO, 2008) e na população total a contribuição africana, européia e ameríndia foi de 49,2%, 36,3% e de 14,5%, respectivamente. Os mesmos marcadores foram analisados em uma amostra de 517 indivíduos da Bahia composta por brancos (17,2%), mulatos (77,5%) e negros (4,3%), classificados fenotípicamente. Neles foi observado que a contribuição africana foi de 30% nos brancos, 47% nos mulatos em geral, sendo 33% nos mulatos claros, 50% nos mulatos médios e 62% nos mulatos escuros, e 62% nos negros (BOMFIM, 2008). Outro estudo, feito em 2010 numa amostra de doadores de sangue na população da Bahia, demonstrou porcentagem semelhantes de contribuição africana, européia e ameríndia das encontradas no estudo de Machado em 2008 (FELIX et. al., 2010).

Para determinar diferenças étnicas entre grupos populacionais utilizam-se pequenas variações no DNA, chamados de polimorfismos. Estes se caracterizam por representarem seqüência de DNA localizada num determinado locus cromossômico que difere de indivíduo para indivíduo, e cujo alelo menos comum possui freqüência de pelo menos 1% (BAMSHAD, 2003).

As variações mais utilizadas para determinar essas diferenças são pequenos fragmentos de DNA conhecidos como polimorfismos de inserção *Alu*. Esses polimorfismos fazem parte da família de DNA repetitivo, SINE (*short interspersed nuclear elements*) e são originárias de um retrotransposon. Ocasionalmente, as seqüências *Alu* replicam-se e as cópias resultantes se dispersam aleatoriamente para novas posições no cromossomo de origem, ou em outro cromossomo (BATZER, DEININGER, 2002).

A mesma seqüência *Alu* entre duas pessoas, no mesmo local de seu genoma, sugere a descendência de um ancestral comum. É improvável que o evento de inserção ocorra duas vezes em um mesmo *locus* (BATZER, DEININGER, 1994).

Estas inserções podem ser excelentes marcadores étnicos e, então, serem utilizadas para estimar a composição étnica de populações híbridas como a população brasileira (MENDES – JR., SIMÕES, 2001).

Mendes-JR e Simões (2001) utilizaram três marcadores de inserção *Alu* (TPA25, PV92 e APO) em uma amostra da população brasileira. Esse estudo revelou que no *locus* PV92 existia um grande diferencial de frequências alélicas entre ameríndios/africanos e ameríndios/europeus, e no *locus* APO entre africanos/europeus. O *locus* TPA25 foi o único que mostrou homogeneidade na distribuição das frequências alélicas em todos os grupos analisados.

Os polimorfismos *Alu* estão inclusos no grupo que se configura como ótimos marcadores de ancestralidade denominados atualmente de AIMs (do inglês *Ancestry Informative Markers*; BONILLA *et al.* 2004). Com o reconhecimento dos AIMs tornou-se possível gerar estimativas mais precisas das proporções ancestrais de uma população miscigenada (PARRA *et al.* 1998; PARRA *et al.* 2001; SHRIVER *et al.* 2003). Estes marcadores podem ser usados para estimar ancestralidade biogeográfica de populações, subgrupos e individuais (SHRIVER *et al.* 2003). O estudo de Parra *et al.* (1998) demonstrou que ao utilizar os marcadores informativos de ancestralidade em uma população norte americana era possível estimar de forma precisa o grau de mistura africana e européia.

Nota-se a importância da utilização desses marcadores para estimar a origem dos povos formadores das populações estudadas. Assim como, juntamente com a análise das bases moleculares de doenças genéticas, avaliam o risco populacional para doenças associadas a determinados grupos populacionais, bem como auxiliam no diagnóstico preciso e esclarecem aspectos obscuros sobre os processos de colonização, miscigenação e associação com os achados moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Analisar a ancestralidade e as características clínicas e histopatológicas de uma amostra de pacientes de alto risco para câncer de mama e ovário hereditário do Serviço de Oncogenética da UFBA.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Comparar as características clínicas e histopatológicas entre o câncer de mama com receptores hormonais positivos e/ou HER-2 positivo e o câncer de mama triplo negativo, e entre as pacientes afrodescendentes e brancas através da análise de prontuários médicos;
- Estimar a mistura populacional (africana, européia e ameríndia) em uma amostra de indivíduos com câncer de mama triplo negativo e em uma amostra com receptores positivos (Receptor Hormonal e/ou HER2 positivos) utilizando marcadores moleculares biparentais (marcadores informativos de ancestralidade - AIMs);
- Estimar a mistura individual no fenótipo triplo negativo;
- Determinar as frequências alélicas dos marcadores específicos de população (AT3-I/D, APO, SB19.3, PV92, FY-null, LPL, CKMM, GC1S e GC-1F);
- Verificar associação entre ancestralidade africana e câncer de mama triplo negativo;
- Verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos AIMs nas amostras analisadas.

4. METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO

Tratou-se de um estudo observacional, descritivo e analítico. Inicialmente, foi feito um levantamento dos cânceres triplo negativo em pacientes afrodescendentes (classificadas fenotipicamente) atendidas no Ambulatório de Oncogenética do COM-HUPES/UFBA, bem como a distribuição de características clínicas e histopatológicas dessas pacientes obtidas através dos prontuários médicos. Posteriormente, esses dados foram comparados com os mesmos dados clínicos de outras pacientes com câncer de mama do Ambulatório que não apresentaram o fenótipo triplo negativo. Foi feito também uma comparação entre as pacientes afrodescendentes e brancas. E finalmente, foram feitas análises moleculares, no Serviço de Oncogenética do ICS/UFBA, através dos marcadores de ancestralidade de todas as pacientes que se encaixaram nos critérios de inclusão. O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FTC.

4.2 AMOSTRA

Tratou-se de uma amostra de conveniência, onde foram avaliados 119 prontuários de pacientes com câncer de mama ou com história familiar atendidos durante o período de janeiro 2007 a julho de 2010, no Ambulatório de Oncogenética do COM-HUPES/UFBA. A ancestralidade e o grupo racial (análise fenotípica) destas pacientes foram obtidos através de questionário dirigido (Anexo II). Todas as pacientes que participaram do estudo assinaram o Termo Livre de Consentimento Esclarecido (TLCE) (Anexo I). O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FTC (Anexo III). Quarenta e quatro prontuários foram excluídos do estudo por não se encaixarem nos critérios de inclusão. Os critérios de inclusão e exclusão foram os seguintes:

4.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com idade igual ou maior do que 18 anos com diagnóstico histopatológico de câncer de mama;
- Que concordaram em fazer parte do estudo e que leram, analisaram e assinaram o TCLE;

- Que tiveram condições de responder o questionário aplicado.

4.2.2 Critérios de exclusão

- Indivíduos com menos de 18 anos ou que não saibam ler e/ou que não tiveram condições de entender plenamente os objetivos e conseqüências do estudo;
- Impossibilidade de se obter o consentimento informado e esclarecido;
- Indivíduos que não se enquadraram nos critérios de inclusão.

4.3 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Os dados clínicos foram obtidos através das análises dos prontuários médicos do Ambulatório de Oncogenética do COM-HUPES/UFBA. Já os dados histopatológicos foram obtidos através da análise dos prontuários dos oncologistas (clínicas públicas ou particulares) que acompanham ou acompanharam as pacientes que participaram da pesquisa.

As informações extraídas dos prontuários dos oncologistas constaram de dados imunohistoquímicos (receptores hormonais, progesterona e estrogênio, e HER-2), histológicos (tipo, grau e estadiamento) e tipo de tratamento. Já os dados extraídos dos prontuários do Ambulatório de Oncogenética constaram de dados clínicos, como por exemplo: idade do diagnóstico, uso de anticoncepcional, procedência (clínicas públicas ou privadas), idade gestacional, menopausa, tabagismo, local de nascimento, recidivas e história familiar de câncer.

4.4 ANCESTRALIDADE FENOTÍPICA E ANCESTRALIDADE REFERIDA

Para a determinação da ancestralidade fenotípica, dois pesquisadores treinados realizaram a classificação fenotípica da ascendência por meio de critérios modificados de Krieger & Parra. Estes critérios foram feitos através da avaliação da cor da pele (branco, marrom ou preto), da forma do nariz (ponta proeminente ou arrebizada, ponta deprimida ou plana), da espessura dos lábios (espessura fina, média ou grossa) e da textura do cabelo (os cabelos lisos, ondulados ou crespos). Os pacientes foram classificados de acordo com suas características fenotípicas, como: branco, pardo ou preto. Por exemplo, se uma pessoa tivesse uma pele

de cor branca com a ponta do nariz arrebitado, lábios finos e cabelos lisos era classificada fenotipicamente como branca, por outro lado se tivesse pele negra, nariz chato, lábios grossos, cabelos encaracolados, era classificada como negra. Mas se as características fossem intermediárias ou mistas entre estas duas era classificada como parda. Um atlas da raça humana foi utilizado para definir e classificar o nariz dos participantes e as formas dos lábios. A ancestralidade referida é à resposta dada pelo paciente em relação à nacionalidade dos pais e avós. Perguntou-se a cada paciente se ele sabia da nacionalidade tanto paterna como materna. Quando o paciente não sabia a origem da nacionalidade era classificado como tendo ancestralidade brasileira – BRAS/BRAS (ABÉ-SANDES, 2010 - comunicação pessoal).

4.5 AMBULATÓRIO DE ONCOGENÉTICA

O ambulatório de Oncogenética do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (COM-HUPES/UFBA) foi criado em 2007 com o objetivo de promover o aconselhamento genético às portadoras de câncer de mama ou ovário, ou com história familiar. O Ambulatório é formado por uma equipe multiprofissional: geneticista, oncologista, hematologista, psicólogo e biólogos que dão todo o suporte necessário a essas pacientes. Além do aconselhamento, as pacientes passam por uma triagem para posterior avaliação dos genes de suscetibilidade ao câncer de mama ou ovário realizado no Serviço de Oncogenética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA).

4.6 ANÁLISE MOLECULAR

4.6.1 Extração de DNA

Das pacientes que se encaixaram nos critérios de inclusão e que concordaram em participar do estudo foi coletada amostra de sangue periférico por punção venosa para a determinação genética de ancestralidade. A partir das amostras de sangue total foi feita a extração de DNA pela técnica de extração salina (LAHIRI & NURNBERGER, 1991). Com o DNA extraído, as amostras foram genotipadas para os marcadores selecionados (Tabela1).

4.6.2 Ancestralidade por marcadores biparentais

Foram selecionados 9 marcadores autossômicos (*AT3-I/D*, *SB19.3*, *APO*, *PV92*, *FYnull*, *CKMM*, *LPL*, *GC-1F* e *GC-1S*) conhecidos como marcadores

informativos de ancestralidade (AIM), que são alelos que apresentam alto diferencial de frequência entre as populações ancestrais (Tabela 1). Estes marcadores foram genotipados por PCR para as inserções e/ou deleções e por PCR seguido de RFLP para as mutações pontuais (Parra *et al.*, 1998). Todos os marcadores selecionados já foram amplamente utilizados em outros estudos e, portanto já validados para este tipo de análise.

*Tabela 1. Loci, tipo de polimorfismo analisado, localização cromossômica, população onde o alelo *1 é mais freqüente e seqüência dos primers.*

<i>Loci</i>	Polimorfismo	Localização	População com maior frequência do Alelo*1
<i>AT3-I/D</i>	76bp <i>indel</i>	1q25.1	Africana
<i>Sb19.3</i>	Inserção <i>Alu</i>	19p12	Europeu
<i>APO</i>	Inserção <i>Alu</i>	11q23.3	Europeu
<i>PV92</i>	Inserção <i>Alu</i>	16q23.3	Ameríndia
<i>FY-Null</i>	A/G	1q23.2	Europeu
<i>CKMM</i>	C/T	19q13.32	Ameríndia
<i>LPL</i>	T/C	8p21.3	Africana
<i>GC*IF**</i>	G/T	4q13.3	Africana
<i>GC*IS**</i>	C/A	4q13.3	Europeu

Alelo*1 – presença da inserção ou ausência do sítio de restrição; ** haplótipo dos polimorfismos nas posições 34 e 45 do gene GC (SANDFORD *et. al.*, 1997)

4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi amplificado para o polimorfismo *indel* (AT3-I/D) e as inserções *Alu* (*Sb19.3*, *APO* e *PV92*) utilizando a técnica de PCR (reação de cadeia da polimerase). As reações da PCR foram feitas contendo os componentes descritos na tabela 2 em termociclador. Os primers utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 2 – Componentes da mistura da reação de PCR.

<i>Locus</i>	KCL	DNA	tris-HCl pH 8,5	<i>Primers</i>	MgCl₂	Gelatina	Taq DNA Polimerase (1U/μL)	dNTP (cada)	Volume Final
AT3- I/D	50 Mm	100 ng	10 mM	0,25 mM	1,5 mM	0,01%	1U	200 mM	25μl
Sb19.3	50 mM	100 ng	10 mM	0,25 mM	1,5 mM	0,01%	1U	200 mM	25μl
APO	50 mM	100 ng	10 mM	0,25 mM	1,5 mM	0,01%	1U	200 mM	25μl
PV92	50 mM	100 ng	10 mM	0,25 mM	1,5 mM	0,01%	1U	200 mM	25μl

A solução da PCR juntamente com o DNA genômico foram colocados no termociclador para a realização da amplificação. O programa utilizado está descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição do programa utilizado no termociclador

1 Ciclo:

- 94° C por 6 minutos;
- Com Temperatura de Pareamento T° por 2 minutos:

<i>AT3-I/D</i>	<i>Sb19.3</i>	<i>APO</i>	<i>PV92</i>
54 °C	66 °C	56 °C	63 °C

35 Ciclos:

- 72°C por 1 minuto;
- 94°C por 30 segundos;
- T° de pareamento por 1 minuto:

<i>AT3-I/D</i>	<i>Sb19.3</i>	<i>APO</i>	<i>PV92</i>
54 °C	66 °C	56 °C	63 °C

1 Ciclo final:

- 72°C por 10 minutos.

Após esses ciclos, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e as bandas, se amplificadas, foram visualizadas em luz ultravioleta. Os resultados da genotipagem desses marcadores foram confirmados em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Para a montagem do gel foi utilizado um tubo falcon, onde foi colocado primeiramente 35ml de poliacrilamida 8% (diluído em TBE 1x) e por último foram adicionados 220µL de Psa (persulfato de amônia) a 25% e 55µL de Temed. Para análise do tamanho dos fragmentos gerados foi utilizado o marcador de peso molecular N3236S da New England Biolabs® de 50pb.

Tabela 4 - Primers utilizados na reação de PCR.

<i>Loci</i>	Seqüência dos primers
<i>AT3-I/D</i>	F: 5'CCACAGGTGTAACATTGTGT3' R: 5'GAGATAGTGTGATCTGAGGC3'
<i>Sb19.3</i>	F: 5'TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG3' R: 5'AAGCACAATTGGTTATTTCTGAC3'
<i>APO</i>	F: 5'AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG3' R: 5'AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA3'
<i>PV92</i>	F: 5'AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT3' R: 5'TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTAG3'

4.6.4 PCR seguido de RFLP

O polimorfismo CG foi amplificado através de PCR seguido de RFLP (polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição). Esta técnica utiliza enzimas de restrição que produzem fragmentos de DNA de tamanho específicos que são utilizados na genotipagem. As enzimas de restrição utilizadas foram StyI e HaeIII.

4.6.5 PCR em tempo real

Além dos marcadores citados também foram analisados polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) (FY-null, LPL e CKMM). A genotipagem para estes polimorfismos foi feita por PCR em tempo real com kits comerciais pela Applied Biosystems.

O sistema utilizado para realização dessa reação foi o TaqMan™ da Applied Biosystems do Brasil. Esse sistema detecta o produto do PCR na medida em que esta vai sendo sintetizada na reação. Baseado no uso de uma sonda, dirigida contra uma região interna da seqüência que se deseja amplificar, e que tem dois fluorocromos, um

em cada extremidade da sonda (um DNA fita simples). Na extremidade 5' há um fluorocromo que só fluoresce se estiver distante fisicamente do fluorocromo na posição 3'. Este segundo fluorocromo funciona como capturador de energia (*quencher*) e não deixa com que a energia luminosa usada para excitar a sonda chegue à quantidade suficiente para excitar o primeiro fluorocromo. Estes dois fluorocromos estão representados como R e Q (para *quencher*). Quando o primer hibridiza na região 5', a sonda também o faz no meio da sequência. Na medida em que a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo R da sonda e permitindo que absorva energia e emita luz. As energias para a excitação dos fluorocromos provem de um feixe de laser que atravessa a amostra (figura 3).

Como cada sonda hibridiza com a sequência alvo gerando sinal fluorescente proporcional à concentração dos produtos amplificados, é possível correlacionar a intensidade de sinal coletada com a quantidade de produto amplificado. Após a amplificação como em um PCR convencional foi feita a discriminação alélica, onde se quantificou a intensidade de cada fluoróforo, correspondendo a um determinado alelo. Os diferentes genótipos emitem fluorescência correspondente a cada alelo marcado, um com o fluoróforo VIC e outro com o fluoróforo FAM. Se ambos os alelos apresentarem fluorescência teremos um genótipo heterozigoto.

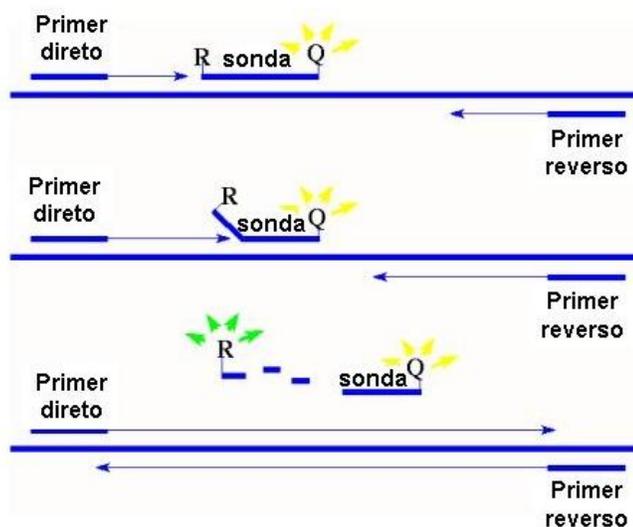


Figura 3 – Representação esquemática do PCR em tempo real. Fonte: http://www.ufpe.br/biolmol/aula7_PCR-RAPD-aplicar.htm/PCR em tempo real.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A estatística descritiva foi utilizada nas análises dos dados clínicos e histopatológicos extraídos dos prontuários médicos. Compararam-se os três principais subgrupos de receptores de câncer de mama, os triplo negativos, os receptores hormonais positivos e os receptores HER2 positivos. Foi feita também uma comparação entre os grupos de pacientes afrodescendentes e brancas. O programa utilizado foi o WinPepi versão 9.4, onde foram calculados o *odds ratio* e o valor de P (Teste de Fisher's). Somente os valores de P acima de 0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Por ser um estudo de natureza retrospectiva, o tamanho da amostra foi limitada e não foi possível aplicar estatística mais complexa.

Os pacientes com câncer de mama para as análises estatísticas dos AIMs foram divididos em dois grupos, aqueles com o fenótipo TN e os que apresentaram pelo menos um receptor positivo (hormonal ou HER2). As frequências alélicas e a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculadas pelo programa GENEPOP versão 4.0 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). O cálculo da estimativa de mistura populacional foi realizado utilizando o programa ADMIX, baseado nas frequências alélicas encontradas e nas das populações ancestrais ameríndias, européias e africanas (SHRIVER et al., 2002), admitindo-se o modelo tri-híbrido (CHAKRABORTY, 1985). Já o cálculo de mistura individual foi realizado através do programa Structure 2.2 (PRITCHARD et al., 2000).

4.7.1 Frequências Alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas foram obtidas por contagem gênica direta a partir da leitura dos géis de poliacrilamida e pela quantidade de fluorescência capturada pelo PCR em tempo real, sendo então utilizadas para a estatística descritiva, utilizando o programa GENEPOP. A frequência alélica é dada por:

$$X_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n}$$

Em que:

X_i = frequência alélica;

n_{ii} e n_{ij} = correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos para o alelo i ;

n = número de indivíduos observados;

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995b) versão 4.0. Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos. No teste de probabilidade, o valor de P corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado. O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H_1) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

4.7.2 Mistura Genética

As estimativas de mistura genética populacional foram obtidas por meio do método de identidade gênica (CHARKRABORTY, 1985) com o auxílio do programa ADMIX3. O ajuste a este modelo é avaliado pelo coeficiente de correlação múltipla (R_2) entre as frequências alélicas nas populações híbridas e aquelas das populações ancestrais (CHARKRABORTY, 1986). Para o cálculo das estimativas de mistura étnica foram utilizadas as frequências das populações parentais descritas na literatura (tabela 5). Foi utilizado também o programa Structure 2.2 (PRITCHARD et al., 2000) com o objetivo de estimar a contribuição ancestral de cada indivíduo estudado, baseado nos genótipos tanto da população de câncer de mama quanto das populações ancestrais (SHRIVER, comunicação pessoal). Esta estimativa foi feita apenas no grupo TN.

Tabela 5 - Frequências do Alelo*1 dos 8 AIMS analisados nas populações parentais (SHRIVER et al., 2002)

Loci	Africano	Europeu	Nativo Americano	AF/EU*	AF/NA*	EU/NA*
AT3-I/D	0.858	0.282	0.061	0.575	0.797	0.222
Sb19.3	0.415	0.903	0.645	0.488	0.230	0.258
APO	0.420	0.925	0.977	0.505	0.557	0.052
PV92	0.225	0.152	0.792	0.073	0.568	0.640
FY-Null	0.001	0.998	1.000	0.997	0.999	0.001
CKMM	0.164	0.313	0.904	0.150	0.740	0.590
LPL	0.971	0.492	0.442	0.479	0.529	0.050
GC*1F**	0.853	0.156	0.156	0.697	0.514	0.183
GC*1S**	0.069	0.607	0.542	0.538	0.473	0.065

* Diferenças da frequência entre as populações Africanas e Européias (AF/EU), Africanas e Nativas Americanas (AF/NA) e Européias e Nativas Americanas (EU/NA).

5 RESULTADOS

No total foram atendidos, no Ambulatório de Oncogenética do COM-HUPES/UBFA, 119 pacientes com diagnóstico confirmado de câncer de mama ou com história familiar. Destes, apenas 75 estavam dentro dos critérios de inclusão do estudo, com idade variando entre 27 a 81 anos. O fenótipo triplo negativo apareceu em 10.6 % das pacientes avaliadas.

A ancestralidade fenotípica mais freqüente nas pacientes com câncer de mama foi a branca (Tabela 6). As pacientes foram classificadas em brancas, mulatas claras, mulatas escuras, mulatas médias e negras, mas em decorrência do pequeno número amostral desses últimos grupos raciais foram reclassificadas em brancas e em afrodescendentes.

Quando se comparou com fenótipo triplo negativo, as afrodescendentes apresentaram freqüência maior (62.5%) quando comparadas com as brancas (Tabela 7). Em relação aos outros marcadores imunohistoquímicos apenas os receptores hormonais positivos apresentaram diferenças estatisticamente significantes (OR 1.15, CI 95%).

Tabela 6 – Freqüência racial fenotípica em pacientes com câncer de mama.

GRUPO RACIAL	N/TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
Afrodescendentes (Negros e Mulatos)	36/75	48
Branças	39/75	52

Em relação à ancestralidade referida 37.5% dos pacientes TN consideraram-se brasileiros natos, ou seja, com ascendência apenas brasileira - BRAS/BRAS. Apenas, 12.5% relacionaram sua ancestralidade com africanos – AFRIC/AFRIC (Gráfico 2). No total 36% dos pacientes com câncer de mama referem possuir ancestralidade brasileira (Gráfico 1).

Tabela 7 – Distribuição da frequência racial fenotípica em pacientes com câncer de mama de acordo com a imunohistoquímica.

RECEPTORES	AFRODESCENDENTES (negros e mulatos)	BRANCAS	OR (95%CI)
	N (%)	N (%)	
RE+/RP+/HER2- (N=39)	21 (52.5)	19 (47.5)	1.15 (0.54 - 3.22)
HER2+ (N=28)	12 (40.7)	16 (59.2)	0.63 (0.25-1.60)
TN (N=8)	5 (62.5)	3 (37.5)	1.94 (0.47- 8.02)

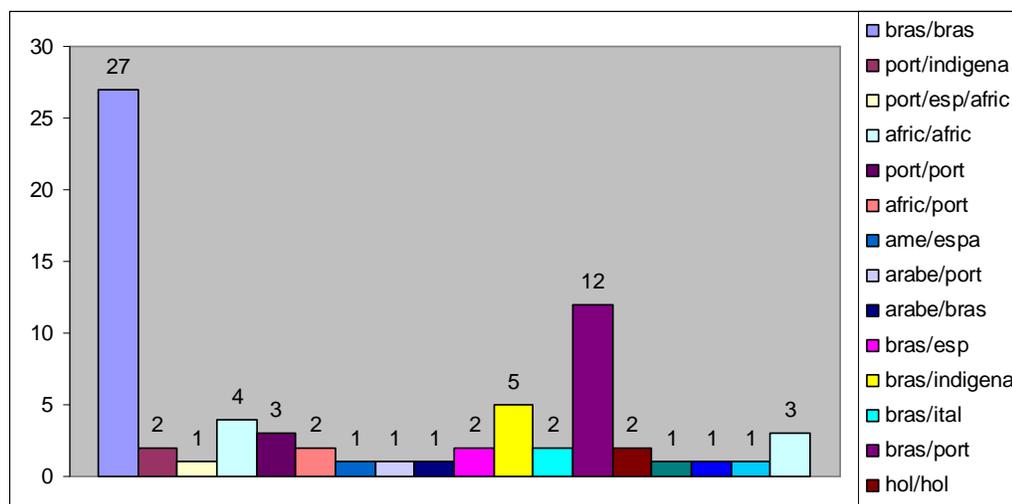


Gráfico 1 – Ancestralidade referida dos pacientes com câncer de mama.

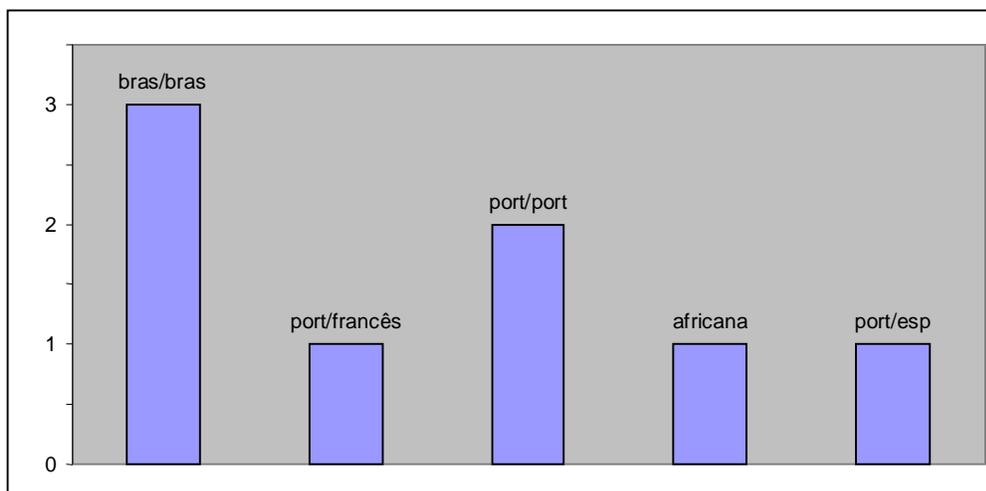


Gráfico 2 – Ancestralidade referida dos pacientes TN.

Na tabela 8 estão descritos todos os dados clínicos dos três principais subgrupos de receptores de câncer de mama. A frequência de pacientes com idade inferior a 50 anos foi maior, 56%. Não existiu diferença estatisticamente significativa na idade entre os pacientes com fenótipo TN e aquelas com pelo menos um receptor positivo (R+), $P=0.278$.

O tabagismo nas pacientes TN e HER2 positivo foi mais frequente que nas pacientes com receptores hormonais positivos. O uso do anticoncepcional não apresentou diferença estatisticamente significativa. A recidiva nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama foi de 8%. Entre pacientes TN e com receptores positivos (R+) a recidiva também não foi estatisticamente significativa (Tabela 8).

Em torno de 28% das pacientes tiveram uma idade gestacional precoce, abaixo de 25 anos, não havendo diferenças entre TN e R+. Apenas uma das 75 pacientes avaliadas no estudo foi encaminhada por uma clínica pública, todas as outras pacientes foram encaminhadas por clínicas particulares.

O número de mulheres menopausadas foi menor (30%) na população total, não havendo diferenças entre os subgrupos R+ e TN. A maioria das pacientes nasceu no interior, apesar da frequência de pacientes HER2 positivas nascidas na capital ser maior (50%). A porcentagem de mulheres que não tiveram nenhuma gestação foi de 14.6%. Apenas 9.3% das pacientes não possuem história familiar de câncer.

Tabela 8 – Comparação de dados clínicos entre os subgrupos de receptores TN e R+.

CARACTERÍSTICAS	TN (N= 8) N(%)	RE+/RP+/HER2- (N=39) N(%)	HER2+ (N=28) N(%)	P
IDADE DO DIAGNÓSTICO				
≤ 50	3 (37.5)	22 (56.4)	17 (60.7)	
> 50	5 (62.5)	17 (43.5)	11(39.2)	0.278
FUMANTE				
Sim	1 (12.5)	9 (23)	5 (17.8)	
Não	7 (87.5)	30 (76.9)	23 (82.1)	0.049
USO DE ANTICONCEPCIONAL				
Sim	5 (62.5)	29 (74.3)	15 (53.5)	
Não	3 (37.5)	10 (25.6)	13 (46.4)	0.572
RECIDIVA				
Sim	1 (12.5)	1 (2.5)	4 (14.2)	
Não	7 (87.5)	38 (97.4)	24 (85.7)	0.260
PROCEDÊNCIA				
Clínicas Particulares	8 (100)	39 (100)	27 (96.4)	
Clínicas Públicas	0 (0)	0 (0)	1 (3.5)	0.010
LOCAL DE NASCIMENTO				
Capital	3 (37.5)	11 (28.2)	14 (50)	
Interior	5 (62.5)	20 (51.2)	4 (14.2)	
Outro estado	0 (0)	7 (17.9)	6 (21.4)	
Não Sabe Informar	1 (12.5)	1 (2.5)	4 (14.2)	0.037
MENOPAUSA				
Sim	2 (25)	12 (30.7)	8 (28.5)	
Não	6 (75)	27 (69.2)	20 (71.4)	0.555
GESTAÇÕES				
≤2.0	3 (37.5)	12 (30.7)	8 (28.5)	
>2.0	3 (37.5)	22 (56.4)	16 (57.1)	
Nenhuma	2 (25)	5 (12.8)	4 (14.2)	0.267
IDADE GESTACIONAL				
≤25 anos	2 (25)	9 (23)	10 (35.7)	
> 25 anos	4 (50)	25 (76.9)	14 (64.2)	0.010
HISTORIA FAMILIAR				
CA ↓50	6 (75)	22 (56.4)	19 (67.8)	
CA ↑50	5 (62.5)	24 (43.5)	17 (39.2)	
Ambos	3	10	8	
Sem história	0	3	4	0.774

A descrição dos dados histopatológicos encontra-se na tabela 9. O grau I e III apareceu em todos os subgrupos de receptores, apesar de haver uma grande porcentagem de pacientes TN sem dados histológicos (37.5%). O estágio I, de acordo com a classificação AJCC, foi o mais freqüente, inclusive no fenótipo TN. A freqüência de pacientes com câncer de mama unilateral foi maior que bilateral. Todos os pacientes presentes nesse estudo apresentaram Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI).

Tabela 9 – Comparação de dados histopatológicos entre os subgrupos de receptores TN e R+.

CARACTERÍSTICAS	TN (N= 8) N(%)	RE+/RP+/HER2- (N=39) N(%)	HER2+ (N=28) N(%)	P
GRAU HISTOLÓGICO				
I Bem diferenciado	2 (25)	15 (38.4)	3 (10.7)	
II Moderadamente diferenciado	0 (0)	12 (30.7)	4 (14.2)	
III Pouco diferenciado	3 (37.5)	9 (23)	6 (21.4)	
IV Indiferenciado	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Não avaliado	3 (37.5)	3 (7.7)	5 (17.8)	0.088
ESTÁGIO AJCC*				
I	3 (37.5)	20 (51.2)	14 (50)	
II	1 (12.5)	15 (38.4)	7 (25)	
III	1 (12.5)	1 (2.5)	3 (10.7)	
IV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Não avaliado	3 (37.5)	3 (7.7)	4 (14.2)	0.046
LOCALIZAÇÃO TUMOR				
Unilateral	8 (100)	34 (87.1)	28 (100)	
Bilateral	0 (0)	5 (12.8)	0 (0)	0.010

*AJCC The American Joint Committee on Cancer

Todas as pacientes TN fizeram o mesmo tipo de tratamento: quimioterapia seguida de radioterapia, sem uso de hormonioterapia. Diferentemente das pacientes R+, onde a freqüência de hormonioterapia foi maior (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação do tipo de tratamento entre os subgrupos de receptores TN e R+.

CARACTERÍSTICAS	TN	RE+/RP+/HER2-	HER2+	P
	(N= 8)	(N=39)	(N=28)	
	N(%)	N(%)	N(%)	
TRATAMENTO				
CIRURGIA:				
Quadrantectomia	2 (25)	12 (30.7)	7 (25)	
Mastectomia	6 (75)	27 (69.2)	21 (75)	
Não	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.078
RADIOTERAPIA:				
Sim	8 (100)	32 (82)	15 (53.5)	
Não	0 (0)	5 (12.8)	13 (46.4)	0.187
QUIMIOTERAPIA:				
Sim	8 (100)	33 (84.6)	28 (100)	
Não	0 (0)	6 (15.3)	0 (0)	0.010
HORMONIOTERAPIA:				
Sim	0 (0)	37 (94.8)	24 (85.7)	
Não	8 (100)	3 (7.6)	4 (14.2)	0.001

Os resultados da comparação dos dados clínicos das pacientes afrodescendentes (AD) e brancas (B) estão descritos na tabela 11. Já a comparação dos dados histopatológicos e o tipo de tratamento entre as pacientes AD e B encontram-se nas tabelas 12 e 13, respectivamente. A prevalência das pacientes AD nascidas na capital foi maior que as B (48.6% x 21%, $P=0.025$), em contrapartida a frequência de brancas nascidas em outros estados e no interior foi maior (68.4%). Assim como o número de recidivas, tanto pacientes AD quanto pacientes B tiveram frequência menor (2.7 % e 13.1%, respectivamente). Nenhuma paciente AD apresentou o câncer de mama bilateral. O tratamento das pacientes B e AD foram semelhantes.

Tabela 11 – Comparação de dados clínicos entre pacientes AD e brancas (B).

CARACTERÍSTICAS	BRANCAS (N=38) N(%)	AFRODESCENDENTES (Negros e Mulatos) (N=37) N(%)	P
IDADE DO DIAGNÓSTICO			
≤ 50	23 (60.5)	20 (54.0)	0.644
> 50	15 (39.4)	17 (45.9)	
FUMANTE			
Sim	10 (26.3)	5 (13.5)	0.248
Não	28 (73.6)	33 (89.1)	
USO DE ANTICONCEPCIONAL			
Sim	21 (55.2)	27 (72.9)	0.151
Não	17 (44.7)	10 (27)	
RECIDIVA			
Sim	5 (13.1)	1 (2.7)	0.020
Não	33 (86.8)	36 (97.2)	
PROCEDÊNCIA			
Clínicas Particulares	38 (100)	36 (97.2)	0.449
Clínicas Públicas	0 (0)	1 (2.7)	
LOCAL DE NASCIMENTO			
Capital	8 (21)	18 (48.6)	0.025
Interior	16 (42.1)	13 (35.1)	
Outro estado	10 (26.3)	4 (10.8)	
Não Sabe Informar	4 (10.5)	2 (5.4)	
MENOPAUSA			
Sim	13 (34.2)	9 (24.3)	0.448
Não	25 (65.7)	28 (75.6)	
GESTAÇÕES			
≤2.0	10 (26.3)	13 (35.1)	0.430
>2.0	20 (52.6)	16 (43.2)	
Nenhuma	8 (21)	7 (18.9)	
IDADE GESTACIONAL			
≤25 anos	8 (21)	9 (24.3)	0.100
> 25 anos	22 (57.8)	28 (75.6)	
HISTORIA FAMILIAR			
CA ↓50	18 (47.3)	19 (51.3)	0.222
CA ↑50	20 (52.6)	11 (29.7)	
Ambos	13	8	
Sem história	20	11	

Tabela 12 – Comparação de dados histopatológicos entre pacientes AD e brancas (B).

CARACTERÍSTICAS	BRANCAS	AFRODESCENDENTES	P
	(N=38) N(%)	(Negros e Mulatos) (N=37) N(%)	
GRAU HISTOLÓGICO			
I Bem diferenciado	4 (10.5)	14 (37.8)	
II Moderadamente diferenciado	14 (36.8)	6 (16.2)	
III Pouco diferenciado	7 (18.4)	12 (32.4)	
IV Indiferenciado	0 (0)	0 (0)	
Não avaliado	13 (34.2)	5 (13.5)	0.647
ESTÁGIO AJCC*			
I	13 (34.5)	15 (40.5)	
II	11 (28.9)	11 (29.7)	
III	5 (13.1)	9 (24.3)	
IV	1 (2.6)	0 (0)	
Não avaliado	8 (21.0)	2 (5.4)	0.626
LOCALIZAÇÃO TUMOR			
Unilateral	33 (86.8)	37 (100)	
Bilateral	5 (13.1)	0 (0)	0.050

*AJCC The American Joint Committee on Cancer

Tabela 13 – Comparação do tipo de tratamento entre pacientes AD e brancas (B).

CARACTERÍSTICAS	BRANCAS	AFRODESCENDENTES	P
	(N=38) N(%)	(Negros e Mulatos) (N=37) N(%)	
TRATAMENTO			
CIRURGIA:			
Quadrantectomia	12 (31.5)	17 (45.9)	
Mastectomia	26 (68.4)	20 (54)	
Não	0 (0)	0 (0)	0.240
RADIOTERAPIA:			
Sim	33 (86.8)	24 (64.8)	
Não	5 (13.1)	13 (35.1)	0.032
QUIMIOTERAPIA:			
Sim	35 (92.1)	34 (91.8)	
Não	3 (7.8)	3 (8.1)	0.480
HORMONIOTERAPIA:			
Sim	31 (81.5)	29 (76.3)	
Não	7 (18.4)	8 (21.6)	0.779

Todos os alelos identificados para estes loci foram encontrados na amostra do presente estudo (Tabela 14). Todos os marcadores utilizados são caracterizados como informativos de ancestralidade por apresentarem um alto diferencial de frequência.

Os loci *Sb19.3*, *APO* e *LPL* foram os que apresentaram maior frequência alélica (alelo 1) em todas as amostras analisadas. O loci *GC*1S* foi mais frequente no fenótipo TN do que no de receptores positivos (Receptores Hormonais e *HER2*) e do que na população total.

Tabela 14 - Frequências alélicas dos pacientes TN, R+ e da população total.

Polimorfismos	Triplo Negativo N=8	Receptores Positivos N=67	Câncer de Mama N=75
<i>AT3-I/D</i>	0.357	0.373	0.371
<i>Sb19.3</i>	0.714	0.833	0.817
<i>APO</i>	0.875	0.682	0.703
<i>PV92</i>	0.214	0.225	0.224
<i>FY-Null</i>	0.214	0.311	0.300
<i>CKMM</i>	0.286	0.311	0.308
<i>LPL</i>	0.667	0.670	0.669
<i>GC*1F</i>	0.417	0.480	0.473
<i>GC*1S</i>	0.500	0.340	0.357

A estimativa de mistura populacional das pacientes com câncer de mama encontra-se na tabela 15, com contribuição africana, europeia e ameríndia de aproximadamente 47%, 44% e 7%, respectivamente (Coeficiente de adaptação ao modelo de 99%). Quando separamos os grupos dos receptores positivos (receptores hormonais positivos e *HER2+*) com os pacientes triplos negativos obtivemos os dados de mistura encontrados na tabela 15. A frequência de pacientes TN com contribuição africana foi maior que a contribuição europeia e ameríndia (50%, 40% e 8%, respectivamente). Em relação à estimativa individual de mistura genética no grupo TN, a maior contribuição foi a europeia (75%) e a menor foi ameríndia (9%), figura 4.

Tabela 15 – Estimativa de mistura entre pacientes TN e R+.

POPULAÇÕES	TN	R+	CÂNCER DE MAMA
	m	m	m
Africana	0.505	0.476	0.479
Européia	0.405	0.452	0.445
Ameríndia	0.089	0.070	0.074

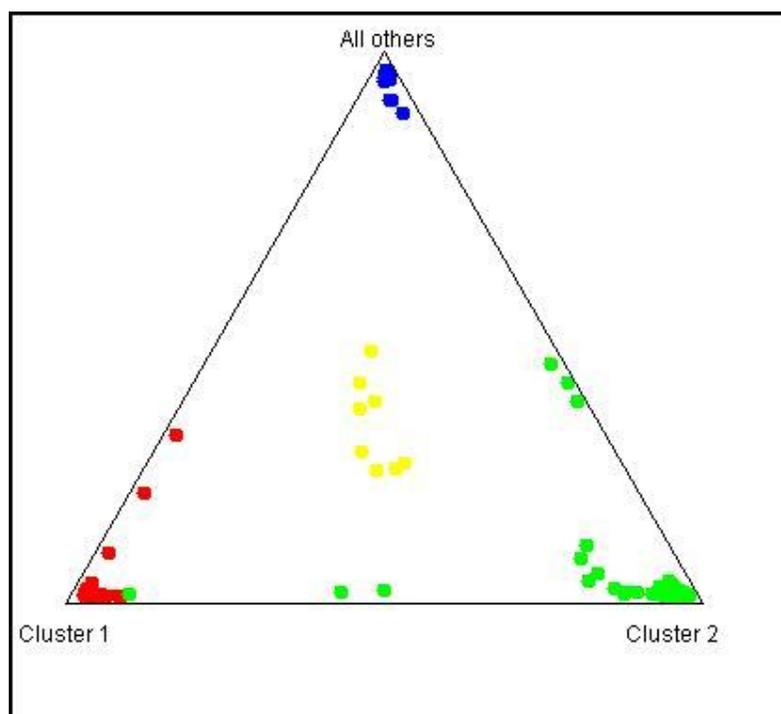


Figura 4 - Agrupamento dos indivíduos TN (círculos amarelos), de acordo com a contribuição dos grupos parentais: europeus (círculos vermelhos), africanos (círculos azuis) e nativos americanos (círculos verdes)

As estimativas de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) encontram-se na Tabela 16. Todos os desvios do EHW observados se encontram em **negrito** nesta tabela. Testes mais sensíveis de déficit e excesso de heterozigotos foram aplicados com o objetivo de explicar os desvios encontrados. Apenas o grupo dos receptores positivos apresentou déficit de heterozigotos nos loci FY-Null e GC (Tabela 17). Nenhum dos dois grupos, TN e R+, apresentaram excesso de heterozigotos.

Tabela 16 - Probabilidades obtidas com o teste exato para a verificação da aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras analisadas.

Teste P		
<i>Loci</i>	TN	R+
SB19.3	1.0000	0.3280
AT3-I/D	1.0000	0.3674
APO	1.0000	0.4160
PV92	1.0000	1.0000
FY-Null	0.2314	0.0219*
CKMM	0.4439	0.2228
LPL	1.0000	0.7631
GC	0.6508	0.0003**

Obs. *Os valores em negrito são diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

** Valores altamente significativos ($p < 0,01$)

Tabela 17 - Probabilidades obtidas com o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para verificar o déficit de heterozigotos.

Déficit de heterozigotos		
<i>Loci</i>	TN	R+
SB19.3	1.0000	1.0000
AT3-I/D	0.6648	1.0000
APO	1.0000	0.8780
PV92	1.0000	0.7850
FY-Null	0.2314	0.0136*
CKMM	0.4439	0.1738
LPL	1.0000	0.7671
GC	0.4165	0.0015**

Obs.*Os valores em negrito são diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

** Valores altamente significativos ($p < 0,01$)

6. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que globalmente, quando comparadas com caucasianas (CA), mulheres afrodescendentes (AD) tendem a ter um carcinoma mais agressivo, apresentando frequentemente negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (carcinoma TN). (DUNN et al., 2010; STARK et al., 2010; VONA-DAVIS; ROSE, 2009). Diferentemente desses estudos, na população da presente pesquisa, a afrodescendência em pacientes TN foi maior na análise fenotípica (tabela 7), mas na estimativa de mistura populacional feitas através dos AIMS não houve diferenças estatisticamente significantes entre pacientes TN e R+ (P=0.218). Embora o pequeno número de pacientes avaliados deva ser considerado. Em relação à ancestralidade referida nota-se que prevaleceu a brasileira tanto na população total quanto no fenótipo TN (Gráficos 1 e 2, respectivamente).

A estimativa de mistura populacional sugere que a população estudada é miscigenada. Isto confirma dados apresentados em outros estudos de ancestralidade feitos na população baiana e brasileira (TAVARES, 2001; BOMFIM, 2008; MARRERO et al., 2005; MUNIZ et al., 2008; FERREIRA et al, 2006).

Um outro dado que reflete o processo de miscigenação dessas populações são as diferenças encontradas entre as frequências alélicas ancestrais (africanos, europeus e ameríndios) e as da população do presente estudo (Tabelas 5 e 14). Os *loci* *Sb19.3*, *APO* e *LPL* foram os que apresentaram maior frequência alélica em todas as amostras analisadas, refletindo uma frequência maior do alelo*1 das populações européias e africanas, dados corroborados pela estimativa de mistura populacional. Apesar do *loci* *GC*IS* ter apresentado uma frequência maior no grupo TN não é possível sugerir diferenças na frequência alélica com o grupo R+ devido ao pequeno número amostral.

A não adesão ao equilíbrio de Hardy-Weinberg relacionada com o predomínio de homozigotos nos loci GC e FY-null ocorreu provavelmente devido ao viés amostral. Além da pequena amostra utilizada, praticamente todas as pacientes vieram de clínicas particulares, favorecendo a coleta de indivíduos com percentual maior de ancestralidade africana, européia ou ameríndia. Apesar de a amostra escolhida ser proveniente de uma Instituição Pública.

Outra possibilidade para o desequilíbrio nesses *loci* seria a influência da ocorrência de casamentos preferenciais, ou seja, uniões/casamentos entre indivíduos do

mesmo grupo racial. Azevedo et al. (1986) apontaram para uma não homogeneidade na miscigenação até mesmo entre grupos urbanos. As uniões entre indivíduos do mesmo grupo étnico estariam favorecendo o aumento das frequências dos genótipos homozigotos para os alelos estudados.

Os dados da estimativa individual de mistura genética nos pacientes TN mostraram uma contribuição européia maior, variando de mais ou menos 75% a 58%. A maior contribuição européia neste grupo de pacientes pode ser explicada pela procedência da amostra da população do presente estudo, praticamente todas as pacientes foram provenientes de clínicas particulares, sugerindo um nível socioeconômico maior. Em 2008, Bonfim demonstrou que existe uma relação entre pacientes AD com nível socioeconômico mais baixo na cidade de Salvador.

Muitos estudos descrevem que a incidência do câncer de mama em mulheres AD é baixa, embora a sobrevida seja menor quando comparadas com mulheres CA (SACHDEV et al., 2010; JANZ et al., 2009; CLEATOR et al.; 2007). Essa diferença na mortalidade pode ser explicada porque mulheres AD apresentam tumores em estágios mais avançados no início dos primeiros sintomas. No presente estudo não foi possível comparar características clínicas e histopatológicas entre as pacientes AD e B no fenótipo TN, devido ao baixo número amostral e pela falta de dados histopatológicos nos prontuários de algumas pacientes TN. Mas ao compararmos as pacientes AD e B na amostra estudada houve uma frequência maior de pacientes nos estágios I e II, segundo classificação da AJCC (tabela 12), diferentemente dos dados apresentados em outros estudos (dados não foram estatisticamente significantes, $P=0.647$).

Por outro lado, outros estudos sugerem que essa alta mortalidade em mulheres AD está relacionada com fatores socioeconômicos (PATEL et al., 2010; ZHOU et al., 2009; DAWOOD et al., 2009; DAWSON et al., 2010). Segundo estas pesquisas, a demora no diagnóstico e no tratamento, resultado da dificuldade no acesso aos centros de saúde, são mais prevalentes na população AD. Além disso, a falta de uma terapia alvo para o fenótipo TN aumenta ainda mais o risco de morte, principalmente em mulheres AD, que não tem acesso aos tratamentos mais avançados. Na amostra utilizada neste estudo não foi possível fazer essas comparações porque, além de não termos nenhum dado sobre o nível socioeconômico, apenas uma paciente do grupo AD teve procedência de uma clínica pública.

Além dessas características, o mau prognóstico de câncer de mama observadas em mulheres AD pode estar associado a fatores hereditários como, por exemplo, mutações no BRCA. Já está bem estabelecido que mutações selecionadas neste gene são mais comuns em populações com ancestralidade comum, exemplo judeus Ashkenazi (STRUEWING et al., 1995; ODDOUX et al., 1996). Por isso é razoável explorar a possibilidade da ancestralidade africana também ser associada com alguma predisposição hereditária ao desenvolvimento do câncer de mama de alto risco.

A tabela 18 descreve uma revisão feita dos estudos que compararam a frequência do fenótipo TN entre a população AD e a CA. Apesar de Carey et al., 2006, comparar carcinomas basais e não somente o fenótipo TN, nota-se que estes estudos apresentam altas frequências do fenótipo TN em pacientes AD comparadas com pacientes CA. Mas vale salientar que as amostras utilizadas nesses estudos foram de populações de países (EUA e Inglaterra) que apresentam um histórico de segregação racial, associado à fatores socioeconômicos, assim como também ocorre no Brasil.

Stark et al. (2010) foi o primeiro trabalho que comparou dados clínicos e histopatológicos de pacientes AD e CA de Michingan (EUA) com AD de Gana (Oeste da África). Segundo o autor pacientes que se autodenominam AD nos EUA apresentam quatro séculos de mistura populacional, por isso tornou-se necessário a utilização de dados clínicos de pacientes provenientes da África para observar se realmente a ancestralidade africana está associada ao fenótipo TN. Embora o estudo apresente limitações, como a falta de alguns dados clínicos dos pacientes de Gana, Stark et al. demonstraram que existe prevalência maior de pacientes TN tanto entre pacientes AD de Gana como de Michingan (tabela 18), apesar desses pacientes também terem dificuldade de acesso ao diagnóstico e tratamento.

Tabela 18 – Frequência do fenótipo TN entre CA e AD em populações dos Estados Unidos (EUA) e Inglaterra.

ESTUDO	TAMANHO DA AMOSTRA/PROCEDÊNCIA	FREQUÊNCIA DO CARCINOMA TN		
		AD	CA	P
Carey et al., 2006	496/ Carolina do Norte (EUA)	46,6% (basal)	21,8% (basal)	< .001
Morris et al., 2007	2230/ Filadélfia (EUA)	20,8%	10,4%	< .0001
Bowen et al., 2008	445/ Londres (Inglaterra)	14,1%	3,8%	< .0001
Moran et al., 2008	1.067/ Connecticut (EUA)	21%	8%	< .0001
Lund et al., 2008	190/ Atlanta (EUA)	29,3%	13%	.050
Stead et al., 2009	415/ Boston (EUA)	12,5%	6,9%	< .0001
Lund et al., 2009	1.501/ Atlanta (EUA)	46,6%	21,8%	< .001
Stark et al., 2010	1263/ Michigan (EUA) e Gana (Oeste da África)	24,4%	14,4%	< .0001

Apesar do presente estudo não apresentar diferenças de idade e status menopausal estatisticamente significantes entre os grupos TN e R+ (Tabela 8), devido, provavelmente, ao número amostral, existem estudos que sugerem a ocorrência do fenótipo TN em pacientes AD jovens e na pré-menopausa (CAREY et al., 2006; OLOPADE et al., 2004; LUND et al., 2008; BOWEN et al., 2008). Também não houve diferenças significantes na comparação da idade e menopausa entre afrodescendentes e brancas (Tabela 11).

Segundo Vona-Davis et al. (2009) e Trivers et al. (2009), fatores como obesidade, especialmente em pacientes jovens e pré-menopausadas, uso de anticoncepcional, tabagismo e idade reprodutiva mais precoce estão associados ao fenótipo TN. Na presente pesquisa, nenhum desses três últimos fatores foi estatisticamente significativo e não houve a avaliação do índice de massa corpórea nessas pacientes (IMC).

Os marcadores moleculares Ki 67 e p53 também foram associados ao fenótipo TN. Apesar do valor prognóstico do marcador p53 não está bem estabelecido, ele parece estar associado à evolução pior quando presente em tumores triplo-negativos (CHAE et al., 2009; MAGGIE et al., 2009). Não foi possível associar esses marcadores com o

fenótipo TN, na presente pesquisa, porque apenas 20% das pacientes apresentaram estudos imunohistoquímicos para esses marcadores.

Em suma, apesar do presente estudo não ter demonstrado a associação do câncer de mama TN com ancestralidade africana, considerando o pequeno número amostral, é necessário identificar as causas das diferenças raciais encontradas em outros estudos, através do uso de marcadores moleculares e do levantamento de dados clínicos, como por exemplo obesidade, e de dados socioeconômicos.

7. CONCLUSÕES

- Ao contrário do que foi visto na literatura até o momento a associação do fenótipo triplo-negativo com a ancestralidade africana não foi evidenciada com o uso da análise da ancestralidade genômica;
- Devido à amostra reduzida não foi possível associar as características clínicas e a faixa etária das pacientes portadoras de neoplasias de mama com o fenótipo triplo-negativo;
- A frequência alélica dos marcadores informativos de ancestralidade não contribuiu para evidenciar uma associação de ascendência africana com o tipo de tumor de mama;
- A baixíssima frequência de pacientes provenientes de hospitais e clínicas da rede pública incluídas neste estudo mostra que há necessidade de uma maior divulgação do serviço de Oncogenética da Universidade Federal da Bahia nesses serviços de saúde.

REFERÊNCIAS

1. ABE-SANDES, K.; SILVA, W.A. JR; ZAGO, M.A. Heterogeneity of the Y chromosome in AfroBrazilian populations. **Human Biology** , v.76, n.1, p.77-86, 2004.
2. ADEMUYIWA, F.O.; OLOPADE, O.I. Racial differences in genetic factors associated with breast cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v.22, p.47-53, 2003.
3. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts e Figures for African American 2007-2008**. Atlanta, GA: American Cancer Society, Inc, 2007.
4. AZEVEDO, E.S. et al. Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil. **Brazil Journal Genetics**, v.3, p.487-496,1986.
5. BAMSHAD, M. J. Human Population Genetic Structure and Inference of Group Membership. **American Journal of Human Genetics**, v.72, p. 578-589, 2003.
6. BARBOSA, A.A.L. et al. Microsatellite studies on an isolated population of African descent in the Brazilian state of Bahia. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n. 1, p.23-30, 2006.
7. BATZER, M.A.; DEININGER, P.L. A human-specific subfamily of Alu sequences. **Genomics**, v.9, p. 481-487, 1994.
8. _____. Repeats of Alu and Human Diversity of Genomic. **Genetics**, v. 3, p. 370-9, 2002.
9. BOMFIM, T. F. **Ancestralidade Genômica em portadores do HIV-1 da Bahia**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador, 2008.
10. BONILLA, C. et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for Complex trait gene mapping. **Annals of Human Genetics**, v. 68, p.139-153, 2004.
11. BORTOLINI, M.C. **Estudos genéticos em comunidades negras semi-isoladas sul-americanas**. 1991. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
12. BOWEN R., DUFFY S, RYAN D, JONES J. Early onset of breast in a group of British black women. **British Journal of Cancer**, v. 98, p. 277-281, 2008.
13. CALLEGARI-JACQUES, S.M.; SALZANO, F.M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v.51, p. 166-174, 1999.
14. CAREY, L.A, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Journal of the American Medical Association**, v.295, n.21, p.2492-502, Jun. 2006.
15. CAVALLI-SFORZA, L.L. ; BODMER, W.F. **The genetics of human population**. San Francisco: W.H. Freeman, 1971.

16. CHABALIER, C. et al. BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. **Cell Cycle**, v.5, n.9, p.1001-7, may 2006.
17. CHAE, B.J. et al. p53 as a specific prognostic factor in triple-negative breast cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 4, p.:217-24, 2009.
18. CHAKRABORTY, R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. Genetic differentiation in human and others animal populations. **Anthropology Associations**, v.4, n.3, p.:171-180, 1985.
19. CLEATOR, S.; HELLER W.; COOMBES, R.C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncology**, v.7, n.4, p.235-44, Apr. 2007.
20. COON, C.S. **The living races of man**. New York: Knopf.1965.
21. DAWOOD, S.J et al. Triple receptor-negative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, n.2, p.220-226, 2009.
22. DAWSON, S.J.; PROVENZANO, E.; CALDAS, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. **European Journal Cancer**.1:27-40, 2009.
23. DUNN, B. et al. Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status. **Breast Cancer Research Treatment** , v.121, p. 282-292, 2010.
24. FELIX, G. E.; ABE-SANDES, K.; BONFIM, T.M. Ancestry informative markers and complete blood count parameters in Brazilian blood donors. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2010.
25. FERREIRA, L. B. et al. Genomic Ancestry of a Sample Population From the State of São Paulo, Brazil. **American Journal Human Biology**, v.18, p.702-705, 2006.
26. GATTÁS, G.J. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.451-458, 2004.
27. GUYTON, Arthur C. **Fisiologia Humana**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
28. HAFFTY, B. G. et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. **Annals of Oncology**, v.20, n. 10, 2009.
29. HAFFTY, B.G. et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. **Annals of Oncology**, v. 20, n.10, p. 1653-9, 2009.
30. HANLEY, K.Z. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression

- in breast carcinomas: comparison on cell block, needle-core, and tissue block preparations. **Cancer Cytopathology**, v.117, n. 4, p.279-88, Aug 2009.
31. HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on the incidence of enzyme polymorphisms. **Annals of Human Genetics**, v.36, p.9-20, 1972.
 32. HERSHMAN D. et al. Racial disparities in treatment and survival among women with early stage breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p.6639–6646, 2005.
 33. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). **Brasil: 500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.
 34. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa do câncer no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
 35. JANZ, N. et al. **Racial/Ethnic differences in Adequacy of Information and Support for Women with Breast Cancer**. [S.l.]: American Cancer Society, 2008 1058-1066.
 36. JANZ, N. et al. Racial/ethnic differences in quality of life after diagnosis of breast cancer. **Journal of Cancer Survivorship**, v.3, n. 4, p.212-222, 2009.
 37. JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2004. American Cancer Society. **CA Cancer Journal for Clinical**, v. 54, p.8–29, 2004.
 38. JOSLYN, S.A.; WEST, M.M. Racial differences in breast carcinoma survival. **Cancer**, v. 88, p.114–123, 2000.
 39. KLEIN, H.S. As origens africanas dos escravos brasileiros. In: PENA, S.D.J. **Em Homo brasilis**. São Paulo: Funpec, 2002.
 40. LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Laboratory of Molecular Neurogenetics, Indiana University Medical Center, Indianapolis 46202-4887. **Nucleic Acids Research**, n.19, p. 5444, 1991.
 41. LI, Y. et al. Cigarette smoking, cytochrome P4501A1 polymorphisms, and breast cancer among African–American and White women. **Breast Cancer Research**, v.6, R460–R473, 2004.
 42. LUND, M.J. et al. Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes: a population-based study and first report. **Cancer**. v. 116, n.11, p.2549-59, 2010.
 43. LUND, M.J. et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 113, n. 2, p. 357-370, 2009.
 44. MACHADO, T. M. B. **Ancestralidade em Salvador-BA**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Salvador.BA, 2008.

45. MAGGIE, C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.101, n.10, p.736–750, May. 2009.
46. MARRERO, A.R. et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal Humuman Biology**, v.17, n.4, p.496-506, jul-aug. 2005.
47. MENDES, C.T.; SIMÕES, A.L. Alu Insertions and Ethnic Composition in a Brazilian Population Sample. **International Journal of Health Geographics**, v. 4, p.249-254, 2001.
48. MILLIKAN, R. et al. HER2 codon 655 polymorphism and risk of breast cancer in African Americans and whites. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.79, p.355-364, 2003.
49. MORAN, M. et al. Long-term Outcomes and Clinicopathologic Differences of African-American Versus White Patients Treated With Breast Conservation Therapy for Early-stage Breast Cancer. **Cancer**, v.113, n.9, p.2565-74, Nov. 2008.
50. MORRIS, G.J. et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Cancer**, v. 110, n.4, p.876-84, 2007.
51. MUNIZ, Y.C. et al. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. **Annals of Human Biology**, v.35, n.1, p.104-111, Jan-Feb. 2008.
52. NEWMAN, L.A. Breast cancer in minority women. In: SINGLETARY, S.E.; ROBB, G.L.; HORTOBAGYI, G.N. (ed.). **Advanced therapy of breast disease**. 2.nd ed. Canada: BC Decker, Inc, 2004. p.713–726.
53. NIELSEN, T.O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.5367–5374, 2004.
54. OLOPADE O. **Journal of Clinical Oncology**, ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 9509.
55. PARRA, E.J. et al. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. **American Journal of Physical Anthropology**, v.114, n.1, p.18-29, 2001.
56. _____. et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **American Journal Human Genetics**, v.63, n.6, p.1839-51, 1998.
57. PATEL, T.A. et al. Breast Cancer in Latinas: Gene Expression, Differential Response to Treatments, and Differential Toxicities in Latinas Compared with Other Population Groups. **Oncologist**, v. 15, n. 5, p. 466-475, May 2010.

58. PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, p.47-752, 2000.
59. PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p.945-959, 2000.
60. RAYMOND, M.; ROUSSET, F.; GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.
61. REIS FILHO, J.S. ; TUTT, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v.52, p.108–118, 2008.
62. ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia: bases patológicas das doenças**. EUA: Elsevier. 2005.
63. ROTTENBERG, S. et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.104, n.29, p.12117-22, Jul. 2007.
64. SACHDEV, J.C. et al. Does race affect outcomes in triple negative breast cancer? **Breast Cancer** (Auckl), v.4, p.23-33, 2010
65. SANDFORD, A.J.; WEIR, T.D.; PARÉ, P.D. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, v. 10, n.6, p.1380-91, jun 1997.
66. SHARON, E. P. Screening and Clinical Implications for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. **J. Mammary Gland Biol Neoplasia**. v. 3, n. 4, 1998.
67. SHRIVER, M.D. et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Human Genetics** , v.112, n.4, p.:387-99, Feb. 2003.
68. _____. Ethnic Variation as a Key to the Biology of Human Disease. **Annals of Internal Medicine**, v.127, v.5, p. 401-403, 1997.
69. SMITH, K. et al. Ethnic disparities in adjuvant chemotherapy for breast cancer are not caused by excess toxicity in black patients. **Clinical Breast Cancer**, v.6, p.260–266, 2005.
70. SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.98, p.10869-10874, 2001.
71. _____. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**,. v.100, p.8418-8423, 2003.
72. STARK, A. et al. African Ancestry and Higher Prevalence of Triple-Negative Breast Cancer. **Câncer**, v.10, p. 01-07, 2010.

73. STEAD, L.A. et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. **Breast Cancer Research**, v.1, p.10, 2009.
74. TAVARES, L.H.D. **História da Bahia**. 10.ed. São Paulo: UNESP; Salvador:EDUFBA, 2001.
75. TRIVERS, K.F. et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. **Cancer Causes and Control**, v.20, p.1071-1082, 2009.
76. VAN DE RIJN, M. et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **American Journal of Pathology**, v.161, p.1991-1996, 2002.
77. VONA-DAVIS, L.; ROSE, D.P. The influence of Socioeconomic Disparities on Breast Câncer Tumor Biology and Prognosis: a review. **Journal of Women's Health**, v.18, n.6, p.883-893, 2009.
78. WINER, E.P. et al. Beyond Anatomic Staging: Are We Ready to Take the Leap to Molecular Classification? In: _____. **American Society of Clinical Oncology Educational Book 2005**. [S.l.]: American Society of Clinical Oncology. 2005. p. 46-59.
79. YANAGIHARA, R. et al. Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-le-grand), v.41, Suppl 1, S145-61, 1995.
80. ZHOU, T. et al. Clinicopathologic features and prognosis of triple negative breast cancer. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 3, n.4, p. 212-22, 2009.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO****ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA**

Coordenadora e Oncologista Responsável:

Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento – CREMEB: 10845

Equipe:

Dra. Kiyoko Abe Sandes; Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento;
Dra. Maria Betânia Pereira Toralles; Dra. Taisa Manuela Bonfim Machado;
Dra. Renata Costa Cangussu; Dra. Songeli Menezes Freire; Dra. Ana
Karina Cangussu Campinho; Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Identificação do paciente:

Nome:

Serviço de origem:

Registro na Unidade/Laboratório:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

Você(s) está(ão) convidado(s) a participar voluntariamente de um estudo que será realizado dentro do complexo universitário e faz parte dos processos de ensino e pesquisa. Este estudo é parte de um projeto de

pesquisa que identificará a contribuição dos índios, dos africanos e europeus na formação da nossa população e a relação desta contribuição com o desenvolvimento de determinados tipos de câncer. Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem, peça mais esclarecimentos e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as dúvidas.

Eu, _____

RG _____, concordo em participar do projeto de pesquisa que lida com questões de identificação de ancestralidade, características clínicas e histopatológicas e de genes associados a câncer e sua relação com o tipo de neoplasia e ancestralidade. Serei examinado por uma equipe multidisciplinar, terei o prontuário analisado com coleta de informações e farei vários exames e/ou participarei de procedimentos diversos necessários para o estudo.

Procedimentos:

Eu compreendo que, se eu concordar em participar deste serviço, os técnicos envolvidos farão perguntas a respeito de meus antecedentes médicos, familiares e pessoais. Serei submetido a exame físico e /ou psicológico para avaliação do meu estado clínico e mental. Além disso, poderei ser submetido a coletas de sangue para realização de exames laboratoriais e de análises genéticas e moleculares.

Concordo com a análise do meu prontuário médico existente no serviço onde tenho o acompanhamento oncológico e com a liberação, pelo Serviço de Anatomia Patológica, do material do tumor que foi retirado cirurgicamente para realização de análise imunoistoquímica, molecular e genética.

A participação no estudo também autoriza que as amostras coletadas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde. O material coletado será processado, analisado e estocado no Setor de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Riscos e Desconforto:

Entendo que, para os exames laboratoriais será preciso colher de 20 a 30 mL de sangue venoso o qual poderá ser obtido de uma vez ou mais de uma vez segundo recomendado pelo médico. Os riscos associados a este procedimento são mínimos podendo, contudo, ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses), quando for feita a coleta de sangue. Além disso, tenho

consciência de que o desconforto será o menor possível, pois a coleta será feita por um profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la.

Vantagens:

Percebo que, com minha participação, estarei contribuindo para identificar e diagnosticar o tipo de tumor, caracterizar minha ancestralidade e analisar as bases genéticas da minha patologia e assim permitindo a aquisição de maior conhecimento sobre a doença o que também será útil para ajudar outras pessoas. Se necessário, os médicos e demais participantes da equipe desta Unidade ajudar-me-ão a lidar com minhas dificuldades. Fui informado também que qualquer membro da minha família que deseje obter uma orientação clínico-genética poderá ser atendido neste serviço caso tenha a devida indicação ou encaminhado a outro serviço quando necessário.

Sigilo:

Foi-me assegurado que toda a informação médica, incluindo os resultados dos exames realizados, fará parte do meu prontuário e será submetida aos regulamentos do Hospital estando protegida pela lei do sigilo. Os técnicos comprometem-se a manter todas as informações obtidas, tanto das anamneses quanto dos resultados dos exames realizados sob o máximo sigilo para que a minha privacidade permaneça plenamente resguardada.

Publicação Científica:

Foi-me garantido que na publicação de resultados parciais ou totais em revistas científicas ou congressos será mantido o sigilo da minha identidade e preservada a minha privacidade e nenhum nome será citado, mas apenas códigos de identificação que serão reconhecidos pelos próprios técnicos.

Fornecimento de Informação Adicional:

Informaram-me ainda, que posso requisitar informações adicionais relativas à doença, riscos e prognóstico bem como a possíveis tratamentos.

Recusa ou Descontinuação da Avaliação:

A respeito da minha decisão, de querer ou não aceitar as condições aqui descritas, reconheço que a minha anuência é voluntária e que me resguardo o direito de recusar ou retirar o meu consentimento para me submeter a exames ou intervenções clínicos ou psicológicos, a qualquer momento. No entanto, na qualidade de paciente comprometo-me a, antecipadamente, comunicar à equipe técnica sobre a minha decisão de não

continuar participando dos exames ou intervenções sugeridas para que a minha decisão não prejudique o bom andamento dos trabalhos que estão sendo desenvolvidos nesta Unidade de Aconselhamento.

Nome do participante:
Assinatura do participante:
Nome da testemunha:
Assinatura da testemunha:
Local e data:

**CLÁUSULA A SER LIDA E ASSINADA PELO
TÉCNICO RESPONSÁVEL:**

Informo que expliquei ao paciente _____ sobre as implicações da sua participação na avaliação realizada nesta Unidade comprometendo-me a esclarecê-lo(a) a respeito de exames, procedimentos necessários ou quaisquer intervenções relevantes para a identificação das alterações genéticas e fatores de riscos. Comprometo-me a alertar o paciente sobre os possíveis riscos bem como as vantagens que poderão advir destes procedimentos. Comprometo-me também a responder a questionamentos do paciente usando, para este fim, o melhor do meu conhecimento. Ratifico a minha responsabilidade, especialmente frente ao pessoal auxiliar, de continuamente enfatizar a necessidade de se manter sigilo absoluto sobre as informações obtidas nos diversos procedimentos realizados neste serviço. Assumo ainda a responsabilidade de fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao paciente, após assinatura de todos os envolvidos, ficando outra cópia anexada ao prontuário do paciente.

Nome do técnico responsável:
CREMEB:
Assinatura do técnico:
Local e data:

ANEXO II

ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER
DE MAMA NO ESTADO DA BAHIA

Questionário 1

	Data da entrevista:	Entrevistador(a):
	Nome do paciente: _____	
	Nome do Pai: _____	
	Nome da Mãe: _____	
	Filiação Biológica: ()1. Sim ()2. Não ()3. Não sabe informar	
	Data de Nascimento:	
	Sexo: ()1. Feminino ()2. Masculino	
	Cidade de residência:	De nascimento:

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PACIENTE

	Raça/Cor (Auto-denominação): ()1. Negro ()2. Pardo ()3. Branco ()4. Indígena ()0. Outros
0.	Raça/Cor (Análise fenotípica): ()1. Negro ()2. Mulato Escuro ()3. Mulato Médio ()4. Mulato Claro ()5. Branco ()0. Outros

ANCESTRALIDADE REFERIDA DOS PAIS E AVÓS DO PACIENTE

1.	<p>Pai : ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro: ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>
2.	<p>Mãe: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>
3.	<p>Avó Materna: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>
4.	<p>Avô Materno: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>
5.	<p>Avó Paterna: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>
6.	<p>Avô Paterno: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar</p> <p>Local de nascimento:</p>

DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS – CÂNCER DE MAMA

7.	<p>Estadiamento: ()1. I ()2. II ()3. III ()4. IV</p> <p>T: N: M: () () ()0. Não tem dados</p>
8.	<p>Tipo histológico:</p> <p>()1. Carcinoma ductal infiltrante ()2. Carcinoma ductal “in situ” ()3. Microinvasão: Sim () Não ()</p> <p>()4. Outros:</p> <p>Grau histológico:</p> <p>()1. Bem diferenciado ()2. Moderadamente diferenciado ()3. Pouco diferenciado ()4. Indiferenciado ()5. Não avaliado.</p>

9.	<p>Imunoistoquímica ()1. Sim; Onde foi realizada? ()2. Não</p> <p>RE: ()1 :0 ()2.+ ()3 ++ ()4. +++ ()5 +++++</p> <p>RP: ()1 :0 ()2. + ()3. ++ ()4. +++ ()5. +++++</p> <p>HER-2 :()1: 0 ()2:+ ()3:++ ()4:+++</p> <p>TP53: ()1. Neg ()2. Pos ()0. Não tem dados</p> <p>KI-67: ()1. Neg. ()2. Pos ()0. Não tem dados</p>
0.	<p>Data do diagnóstico histopatológico – Onde foi realizado-</p>
1.	<p>Tratamento:</p> <p>1. Cirurgia: ()1. Sim ()2.Não</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo: ()1. Quadrantectomia ()2. Mastectomia <p>2. Esvaziamento axilar: ()1. Sim ()2. Não</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfonodo sentinela: ()1. Sim ()2.Não <p>3. Radioterapia: ()1. Sim ()2. Não</p> <p>4. Quimioterapia: ()1. Sim ()2. Não</p> <ul style="list-style-type: none"> • Protocolo: ()1.CMF ()2. FAC ()3.AC ()4.AC- T ()5.AC-D ()6. Outro <p>5. Hormonioterapia: ()1. Sim ()2. Não</p> <ul style="list-style-type: none"> • Protocolo: ()1.Tamoxifeno ()2.Inibidor de aromatase ()3. Qual?
2.	<p>Recidiva:</p> <p>()1. Sim ()2. Não</p> <p style="text-align: right;">Data:</p>
3	<p>Tipo de recidiva:</p> <p>()1. Ossea ()2. Visceral ()3. Loco-regional</p>

ANEXO III

 	
Comitê de Ética em Pesquisa	
CEP/PARECER 01,342-2009	Salvador, 14 de setembro de 2009
1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO	
REGISTRO: 1.342 DATA DA ENTRADA: 14/08/2009 REFERÊNCIA: 1º Parecer PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof.ª Ivana Lucia de Oliveira Nascimento PESQUISADORES: Paula Brito, Camila Azevedo, Marcos Silva, Camila Saundes, Lorena Meyer, Lutz Barreto INSTITUIÇÃO: UFBA CURSO: Medicina	
TÍTULO DA PESQUISA: Análise da ancestralidade e de genes de susceptibilidade em portadores de câncer de mama e de próstata no estado da Bahia.	
OBJETIVO: Estudar a associação entre a ancestralidade, os genes de susceptibilidade e as características clínicas e histopatológicas de uma amostra de portadores de câncer de mama e de próstata do Estado da Bahia.	
2. PARECER DO RELATOR (A):	
O projeto atende os requisitos éticos de pesquisa na área de saúde humana. Salvo melhor juízo sou de parecer pela aprovação deste projeto.	
3. PARECER DO CEP:	
Apresentado a este Comitê para análise ética, segundo a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde. Cópia do projeto arquivado em nossa secretaria. Após apresentação pelo relator e discussão pelos Conselheiros o projeto foi considerado:	
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Com pendência -60 dias para encaminhar o que foi sugerido. <input type="checkbox"/> Reprovado	
venciosamente,	
Dr. MOYSES SADI GURSKY Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa SOMESB	
Av. Antônio Carlos Brito, 3012, Mar. de 4, nível 2 - Palácio de Governança - CEP 41.164-500 Fone: (71) 3343-2000 Fax: (71) 3343-2009 E-mail: etica@fuprecursos.org.br / www.fuprecursos.org.br	