

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

POLIMORFISMOS DOS GENES *TP53* E *MDR-1*,
SUSCEPTIBILIDADE E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Mónica Beatriz Mayorano

RIBEIRÃO PRETO

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



POLIMORFISMOS DOS GENES *TP53* E *MDR-1*,
SUSCEPTIBILIDADE E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Mônica Beatriz Mayorano

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutor
em Ciências, área de concentração Genética.

Orientador: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

RIBEIRÃO PRETO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Mayorano, Mónica Beatriz

Polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1*, susceptibilidade e resposta à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama.

Ribeirão Preto, 2008

95 pp. 28cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Genética.

Orientador: Takahashi, Catarina Satie

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
(Processo nº 400887/2005-3)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/USP - FAEPA-HCRP
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP/USP
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HCFMRP/USP

*A mis padres **Juan Francisco** y **Marta Elisa***

*Por todo el amor, cariño y apoyo
incondicionales en cada momento
de mi vida. Los amo!!!!*

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi**, por ter aceitado me orientar na elaboração deste trabalho, pela oportunidade de aperfeiçoamento e maturidade profissional, além do grande exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

À **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pela simpatia, carinho e gratos momentos durante estes anos no laboratório.

À **Profa. Dra. Nilce Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela atenção e apoio dispendidos.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, Coordenador da Pós - Graduação do Departamento de Genética, pelo carinho, atenção e alegria que recebe a todos os alunos que se integram a esta instituição e pela grande dedicação para ter um curso melhor a cada dia. Se não fosse pela sua mediação, nunca teria chegado em Ribeirão Preto.

À **Profa. Dra. Lúcia Martelli**, ex-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética da FMRP-USP tão empenhada na luta pela qualidade do nosso curso.

Ao **Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade**, pela simpatia e disposição para o desenvolvimento desta pesquisa, pela sua competência profissional e valiosa ajuda na execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara**, pela simpatia e carinho, pela disposição e paciência para dissipar as dúvidas a toda hora, pelo profissionalismo e grande colaboração na realização deste trabalho.

À **equipe de enfermeiras, funcionários e médicos e residentes** do Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas, pela disposição, paciência e ajuda durante a obtenção das amostras de pacientes e controles.

Aos técnicos do laboratório, **Sueli e Júnior**, por toda a assistência prestada, ensinamentos, bons momentos no laboratório e a amizade.

Às funcionárias **Cleusa, Maria Aparecida, Susie** e ao **Gustavo** da secretaria do Departamento de Genética da FMRP-USP, pela atenção e ajuda prestada em todos os momentos.

Aos **professores** do Departamento de Genética, pelos ensinamentos e colaboração com a minha formação acadêmica e profissional.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, pela disponibilidade de análise desse trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

À **Raquel**, pela grande ajuda e colaboração desde o início até o fim deste trabalho, pela agradável companhia durante a coleta das amostras e no laboratório, e pela amizade.

À **Ana Claudia, Aline** e especialmente a **Vanessa**, pela ajuda na revisão do português da tese (entre outras correções) e pelas agradáveis e intermináveis conversas.

À **Ana Paula** e o **Daniel**, pelos momentos de descontração e pela sua amizade.

À **Viviana** e a **Patrícia**, pelos bons momentos de convívio e pela amizade, são muitas as histórias que ficaram na memória.

Ao **Ste**, que sempre está ai (nem que seja online) para me ajudar e emprestar um ouvido (quando necessário), muito obrigada pela sua amizade e sobre tudo pela paciência.

À todo pessoal do laboratório Citogenética e Mutagênese. Aos que já saíram (**Carmen, Luciana, Marjori, Maria Sol, Carla, Cássia, Cleide, Marcelo, Ste Douglas, Ana Lúcia, Gilmara, Maria Clara, Gustavo**) aos que me acompanharam todos esses anos (**Ana Paula, Patrícia Igor, Danilo, Paulo**) e ao mais recentes (**Aline, Ana Cláudia, Cristiano, Danillo, Vinícius, Leonardo, Giovana, Gustavo, Flavia, Juliana**), obrigada pela amizade, os bons momentos, as conversas, pelo companheirismo e sobre todo pelo convívio. Vocês foram minha família durante todo esse tempo.

Ao pessoal do laboratório de Bioinformática (**Renato, Gabi, Saulo, Daniel, André e Luciano**) pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos, **Alejandro** (sempre dando uma mão na estatística) e **Silvina** e seus filhos **Francisco** e **Victoria, Maria Sol** e **Diana**, pelos agradáveis momentos “argentinos”.

Ao pessoal dos demais laboratórios que compõem o Departamento de Genética. São tantos que ficaria impossível mencionar a todos sem esquecer de ninguém. A todos vocês, obrigada pela amizade e companheirismo tão agradáveis durante esses anos todos.

A todos meus amigos fora do âmbito do laboratório, obrigada por todos esses anos no Brasil, porque sempre me fizeram sentir como “en casa”.

A minha irmã (**Silvina**), meu irmão (**Fernando**), minha cunhada (**Soledad**), aos tios e primos (que não são poucos), a minha melhor amiga (**Natalia**) e demais amigos na Argentina, que a pesar da distância sempre estiveram bem pertinho,

torcendo por mim e me apoiando durante todos esses anos. Obrigada pelo enorme carinho!

As **pacientes** que apesar do difícil momento, gentilmente aceitaram participar desta pesquisa, pelo exemplo de luta e coragem; e também, às **doadoras** que aceitaram participar como controles. Todas vocês foram essenciais na realização deste trabalho.

A **CAPES** por viabilizar a realização deste trabalho, na forma de concessão de uma bolsa de doutorado.

À **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais do câncer de mama	1
1.2. A quimioterapia	5
1.3. Polimorfismos do gene <i>TP53</i>	7
1.4. Polimorfismo do gene <i>MDR-1</i>	10
2. OBJETIVOS	13
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1. Caracterização da amostra	14
3.2. Extração e quantificação de DNA genômico	15
3.3. Genotipagem e PCR-RFLP	16
3.3.1. Detecção dos genótipos do gene <i>TP53</i>	16
3.3.2. Detecção dos genótipos do gene <i>MDR-1</i>	19
3.4. Estimativa da resposta	20
3.5. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23

4.1. Detecção dos polimorfismos	23
4.2. Distribuições dos genótipos dos genes <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i>	25
4.3. Distribuições dos genótipos dos genes em <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i> relação à idade, etnia e fatores de risco para câncer de mama	28
4.4. Distribuições dos genótipos dos genes em <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i> de acordo com as características das pacientes antes do tratamento neoadjuvante	35
4.5. Distribuições dos genótipos dos genes em <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i> de acordo com as respostas clínica e patológicas, após a quimioterapia neoadjuvante	41
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Polimorfismos dos genes em <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i> e a susceptibilidade genética	46
5.2. Polimorfismos dos genes em <i>TP53</i> e <i>MDR-1</i> e a resposta à quimioterapia neoadjuvante	51
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO	69
ANEXOS	84

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A quimioterapia neoadjuvante tem sido introduzida para diminuir o tamanho do tumor, permitindo a conservação da mama e ganhando controle sobre possíveis metástases. Polimorfismos em genes envolvidos no reparo do DNA, controle do ciclo celular, apoptose e enzimas do metabolismo e eliminação de drogas, poderiam determinar a susceptibilidade individual ao câncer e a resposta ao tratamento. A proteína p53 é um fator de transcrição envolvido, entre outras funções, no processo de apoptose. Por outro lado, a glicoproteína P é uma proteína de transmembrana responsável pelo efluxo de drogas nas células. Polimorfismos do gene *TP53*, Arg72Pro e Pro47Ser, tem sido observado alterando o potencial de indução de apoptose; quanto ao polimorfismo C3435T do gene *MDR-1*, tem demonstrado sua influência sobre a atividade ou expressão da glicoproteína P. O presente trabalho teve por objetivo investigar se os polimorfismos os genes *TP53* e *MDR-1* na susceptibilidade de câncer de mama e na resposta a quimioterapia neoadjuvante. Para isso, 116 pacientes com câncer de mama e 120 indivíduos controles foram genotipados pela da técnica de PCR-RFLP. Analisando os genes *TP53* e *MDR-1*, as freqüências alélicas e genótípicas encontradas foram similares em pacientes e controles para os polimorfismos Arg72Pro e C3435T; no entanto, para o polimorfismo Pro47Ser só foram observados indivíduos apresentando o genótipo selvagem. Os genótipos homozigotos polimórficos para os genes *TP53* e *MDR-1* foram mais freqüentes nos controles não brancos e com idade maior que 50 anos, respectivamente, sugerindo uma associação dos respectivos genótipos com etnia e idade. Não foi encontrada associação com as demais variáveis em relação ao risco de câncer de mama. Também não foram observadas associações entre as características pré-tratamento das pacientes em relação à distribuição dos genótipos. Quanto à resposta à quimioterapia, não houve associação significativa quando as respostas clínicas e patológicas foram avaliadas. Porém, na distribuição do número de linfonodos, encontraram-se freqüências aumentadas nos genótipo Pro/Pro do gene *TP53* para 1-3 linfonodos metastáticos e no genótipo TT do gene *MDR-1* para ≥ 4 linfonodos axilares metastáticos. Com base nesses dados, não foi possível estabelecer associações entre os polimorfismos e a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama, como também não foi possível determinar sua relação com a resposta à quimioterapia neoadjuvante na nossa amostra. No entanto, mais estudos devem ser feitos para determinar a contribuição destes polimorfismos no câncer de mama e seu tratamento, e assim estabelecer estratégias de quimioterapia mais eficazes.

ABSTRACT

“Polymorphisms of the *TP53* and *MDR-1* genes, susceptibility and response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer”

Breast cancer is the second most common cancer in the world and the most common among women. Neoadjuvant chemotherapy has been introduced to downstage tumors, facilitating breast conservation and gaining control of probably metastasis. Polymorphisms in genes involving DNA repair, cell cycle control, apoptosis and drugs metabolizing enzymes could determine the individual susceptibility to cancer and response to treatment. The p53 protein is a transcription factor and among other functions, is involved in apoptosis. Moreover, the P-glycoprotein is a transmembrane protein responsible for drug efflux from the cells. Polymorphisms of the gene *TP53*, Arg72Pro and Pro47Ser, have been observed an altered apoptosis-inducing potential; whereas, the polymorphism of the gene *MDR-1*, C3435T, has demonstrated influence on the P-glycoprotein activity or expression levels. In this study, our purpose was to investigate whether *TP53* and *MDR-1* polymorphism would be involved with breast cancer risk and the response to neoadjuvant chemotherapy. We analyzed 116 patients with breast cancer and 120 health controls by PCR-RFLP technique. The genotypic and allelic frequencies for Arg72Pro and C3435T polymorphisms in patients and controls were similar. For the Pro47Ser polymorphism, only individuals with the wild-type genotype were observed. The polymorphic homozygous genotypes of the *TP53* and *MDR-1* genes were more frequent in controls for the “non white” group and for the >50 years group, respectively, suggesting an association with genotypes and their ethnicity and age. There was no association with the other variables analyzed for breast cancer risk. The distribution of pretreatment patient characteristics was not significantly different among the polymorphic variants. Furthermore, no association was observed when the clinical and pathological responses were evaluated. However, patients with the Pro/Pro variant (*TP53* gene) and patients with the TT (*MDR-1* gene) were more likely to have 1-3 and ≥ 4 metastatic axillary lymph nodes, respectively. Based on these data, it was not possible to determine associations between polymorphisms and susceptibility to breast cancer neither to the response to neoadjuvant chemotherapy in our sample. However, further studies should be done to determine the contribution of these polymorphisms in the breast cancer risk and its treatment, and thus, establish strategies for more effective therapies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais do câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, entre os casos novos de câncer em mulheres, cerca de 22% são de mama. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007), o número de casos novos esperados em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil mulheres e pontualmente, para o estado de São Paulo, é de 72,52 casos a cada 100 mil mulheres.

A incidência de câncer de mama feminino apresentou crescimento contínuo na última década, o que pode ser resultado de mudanças sócio-demográficas e acessibilidade aos serviços de saúde. Feuer e colaboradores (1993) inferiram que esse aumento foi atribuído ao incremento dos estudos mamográficos nos anos 80. Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico quando diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade causadas pelo câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença, na maioria dos casos, ainda é diagnosticada em estádios avançados.

As causas do câncer de mama ainda são desconhecidas. O principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama é o sexo do indivíduo, como fica claramente evidenciado na relação homem : mulher (1:100) (Ahearne, *et al.* 1999),

diferença, atribuída aos efeitos dos hormônios ovarianos. Este fato é demonstrado pelos dados epidemiológicos que retratam o elevado risco de câncer de mama; quando a idade da menarca é menor que 11 anos; a mulher é nuligesta ou tem seu primeiro parto depois dos 30 anos; menopausa posterior aos 55 anos; ou utilização de reposição hormonal por mais de 10 anos (Henderson e Bernstein, 1996).

Não existem medidas práticas específicas para a prevenção primária do câncer de mama que sejam aplicáveis à população, embora estudos tenham sugerido que a prevenção de hábitos como o tabagismo, o alcoolismo, a obesidade e o sedentarismo possam reduzir o risco de câncer de mama (Kristensen e Borresen-Dale, 2000; Hulka e Moorman, 2001). Avanços tecnológicos têm sido obtidos e direcionados para o diagnóstico precoce e também para o tratamento, que se destacam na melhora da sobrevida média das pacientes, que atualmente é de 61% (após 5 anos), na população mundial (INCA, 2007).

O câncer de mama é uma neoplasia maligna que tem sua origem na proliferação acelerada e descontrolada de células que cobrem, em 70-80% dos casos, o interior dos ductos responsáveis pelo transporte do leite (Figura 1). Este tipo de câncer de mama é conhecido como carcinoma ductal. Em 10-20% dos casos, o câncer tem sua origem no interior das próprias glândulas mamárias, subdividida em lóbulos, sendo chamado de carcinoma lobular. Existem outros tipos de câncer de mama (tubular, medular, papilar, mucinoso, entre outros), mas eles são raros e sua frequência varia de 5-10% do total dos casos. Muitos cânceres de mama encontram-se confinados na luz dos ductos ou lóbulos sem invadir os tecido vizinhos. Nesse caso, recebem o nome de carcinomas *in situ*. Quando estes

proliferam, atravessando a membrana basal e estendem-se infiltrando os tecidos que circundam os ductos e lóbulos, recebem os nomes de carcinoma ductal e lobular infiltrante (ou invasivo), respectivamente.

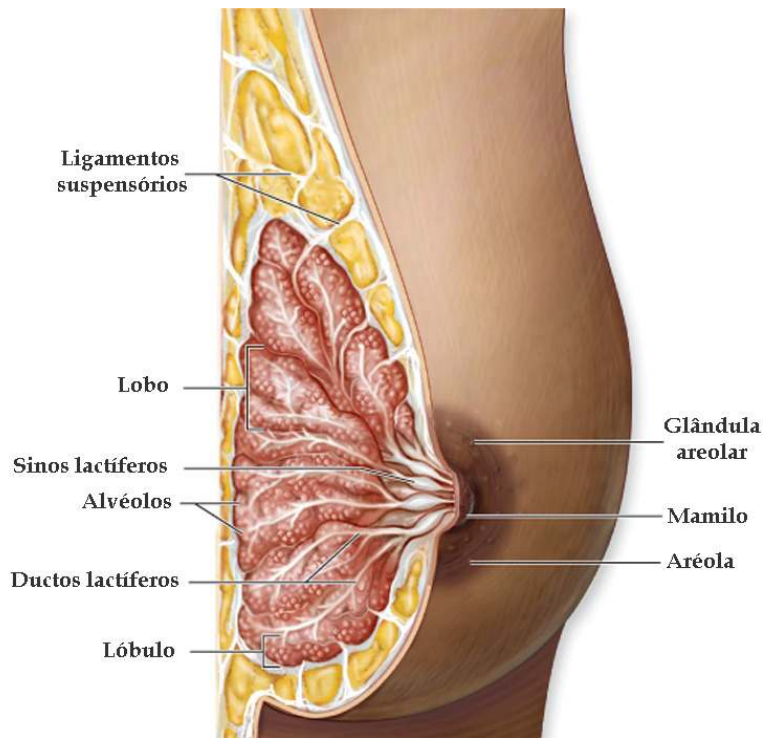
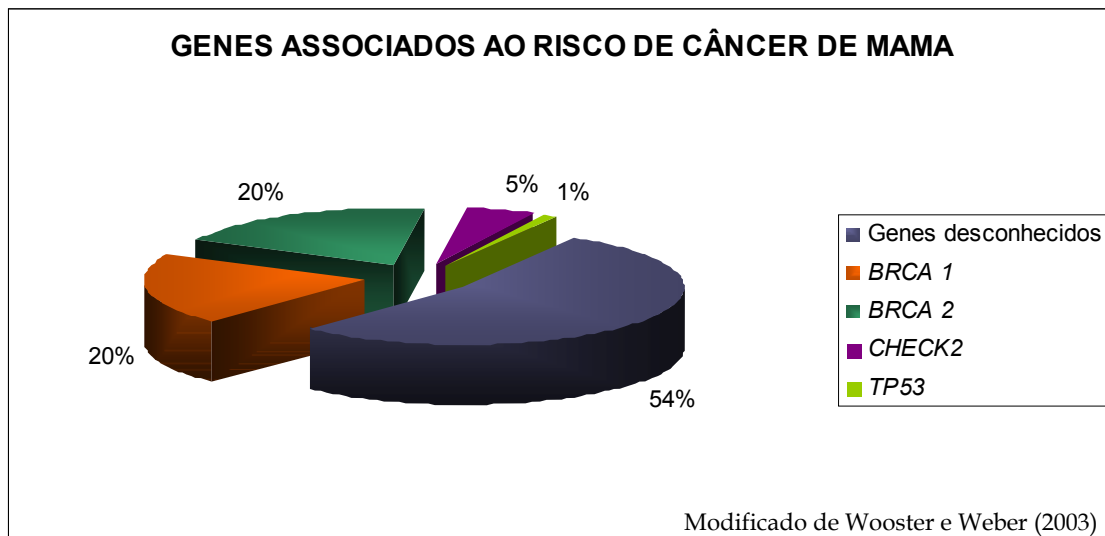


Figura 1. Desenho da mama feminina. Modificado de McGraw-Hill Companies, Inc.

Embora apenas 5–10% da incidência do câncer de mama esteja geneticamente relacionada à herança de mutações altamente penetrantes, a influência da história familiar sobre o subsequente risco de câncer de mama é grande (Cummings e Olopade, 1998; Tsongalis *et al.*, 1998). Mutações nos genes *BCRA1* e *BCRA2* ocorrem em aproximadamente 20% das famílias com evidência de susceptibilidade herdada ao câncer de mama. Já no gene *TP53*, mutações na linha germinal não acometem mais do que 1% dos casos de câncer de mama familiar (Garber *et al.*, 1991) e para mutações no gene da quinase (*CHECK2*), responsável pelo controle do ciclo celular, esse valor é próximo de 5% de todos os

casos (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002) (Figura 2). Os casos restantes de câncer de mama (54%), presume-se que sejam devido a um indefinido número de genes com diversos graus de penetrância envolvidos com susceptibilidade, a exposição à fatores hormonais e ambientais e à eventos genéticos estocásticos (Wooster e Weber, 2003).



Muitas variantes genéticas em alelos de susceptibilidade com baixa penetrância poderiam elevar moderadamente o risco de câncer de mama. Estas variantes genéticas são muito mais freqüentes nas populações do que as alterações em genes de alta penetrância e, desse modo, essas variantes juntas poderiam ter substancialmente uma maior contribuição para o câncer de mama na população do que as mutações em genes de alto risco (Dunning *et al.*, 1999). Polimorfismos em genes envolvidos no reparo do DNA, controle do ciclo celular, apoptose ou enzimas metabólicas poderiam determinar a susceptibilidade individual ao câncer e à resposta ao tratamento (Goode *et al.*, 2002). Genes de baixa penetrância poderiam se combinar aditiva ou multiplicativamente e contribuir na incidência

de câncer ou modificar a resposta à quimioterapia. A lista destes genes potenciais está diariamente em crescimento.

1.2. A quimioterapia

O sucesso dos tratamentos, tanto no câncer de mama quanto nos demais tipos de câncer, depende diretamente do acúmulo ótimo de droga no tumor. Os tumores sólidos apresentam obstáculos que não permitem aos diferentes compostos alcançar a concentração necessária. Outros mecanismos, independentes das transformações nas células tumorais, poderiam estar envolvidos limitando a resposta terapêutica aos quimioterápicos. Dentre esses mecanismos poderiam ser incluídas as alterações na farmacocinética da droga, além das diferenças na eficácia biológica, metabolismo e eliminação da droga, ou a inadequada distribuição da droga devido a considerações anatômicas (fluxo sanguíneo, massa tumoral, etc).

Segundo Morrow e Cowan (1993) os mecanismos gerais de resistência às drogas considerados na literatura são:

- diminuição do acúmulo de droga (incremento do efluxo, aumento do influxo, ou alteração do tráfico intracelular);
- diminuição na ativação da droga;
- aumento da inativação da droga ou seus intermediários tóxicos;
- aumento do reparo do dano induzido pelas drogas;
- alteração da droga alvo (quantitativamente ou qualitativamente);

- alteração de co-fatores ou níveis de metabólitos;
- alteração da expressão gênica (mutação, deleção, ou amplificação do DNA);
- alteração da transcrição, processamento pós-transcricional ou tradução;
- alteração da estabilidade molecular.

A quimioterapia neoadjuvante, também conhecida como quimioterapia primária ou pré-operativa, tem sido introduzida com o objetivo de diminuir o estadiamento do tumor, facilitando desse modo, a conservação da mama e também ganhando controle sobre uma provável doença sistêmica existente. Além disso, a quimioterapia neoadjuvante permite uma rápida estimativa da sensibilidade do tumor à quimioterapia dentro de 3-4 meses comparado com os períodos de acompanhamento de mais de 5 anos para avaliar a sensibilidade da quimioterapia adjuvante (Fisher *et al.*, 1998).

A maioria dos agentes anticancerígenos utilizados induz apoptose nas células tumorais. Atualmente, os taxanos e as antraciclinas representam as drogas mais potentes utilizadas no tratamento de câncer de mama (Estevez e Gradishar, 2004). O mecanismo exato de ação das antraciclinas ainda está em debate, mas dentre os múltiplos efeitos intracelulares conhecidos, a inibição da topoisomerase II parece ser o evento molecular final que leva à apoptose (Zunino e Capranico, 1990; Gewirtz, 1999). No caso dos taxanos, a toxicidade é induzida pela estabilização da tubulina com a conseqüente parada do ciclo celular. Estes têm demonstrado promover a apoptose por diversas vias de transdução de sinais, incluindo aquela mediada por p53 (Wang *et al.*, 1999).

As análises de como os cânceres humanos evadem à quimioterapia têm revelado uma rica variedade de alterações genéticas baseadas em células resistentes a drogas e, os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP: *single nucleotide polymorphisms*) têm sido amplamente considerados no estudo da variabilidade de respostas de cada indivíduo frente a diversos fatores.

Os polimorfismos outorgam características diferenciais, tanto biológicas quanto bioquímicas nos seus produtos de expressão e, eles podem ser utilizados como marcadores de susceptibilidade e de resposta ao tratamento no câncer de mama.

1.3. Polimorfismos do gene *TP53*

A proteína p53 é um fator de transcrição multifuncional envolvido na progressão do ciclo celular, na manutenção do DNA e da integridade genômica, no reparo do DNA lesado e na apoptose (Soussi e Beroud, 2001). O gene que codifica esta proteína se encontra no cromossomo 17 e consta de 11 éxons. A presença de mutações no gene *TP53* é umas das alterações genéticas mais freqüentes encontradas numa ampla variedade de cânceres (Hollstein *et al.*, 1991). Esta proteína possui uma região crítica para sinalização de apoptose entre os códons 64 e 92, no éxon 4. Tal região contém uma seqüência rica em prolina com 5 motivos PXXP que abriga um domínio de ligação SH3, o qual é conhecido por ser requerido no processo de apoptose induzido por p53, mas não no bloqueio do ciclo celular (Walker e Levine, 1996; Sakamuro *et al.*, 1997). Interessantemente,

dentro deste domínio, especificamente no códon 72, encontra-se um SNP, em cuja localização pode ter um resíduo prolina (CCC) ou arginina (CGC). As duas variantes polimórficas têm demonstrado possuir, além de diferenças estruturais refletidas nos diferentes padrões de migração de eletroforese, algumas propriedades bioquímicas e biológicas diferentes (Harris *et al.*, 1986; Matlashewski *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1999).

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* destacam a diferença funcional entre as variantes prolina (Pro72) e arginina (Arg72), onde a forma Arg72 do gene *TP53* do tipo selvagem, aporta um potencial de indução de apoptose maior que a variante Pro (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Pim e Banks, 2004; Sullivan *et al.*, 2004). Para explicar esse fato, tem sido postulado que ao menos uma das fontes desse potencial apoptótico aumentado deve-se à maior capacidade da forma Arg72 no gene *TP53* para se localizar na mitocôndria com a conseqüente liberação do citocromo C no citosol (Dumont *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstram que a presença do resíduo Arg72 ou Pro72 é crucial para a ligação das proteínas da família ASSP ao DNA, as quais estão envolvidas no crescimento celular e apoptose durante a oncogênese em tumores (Bergamaschi *et al.*, 2006).

Existem controvérsias quanto aos estudos que associam o risco de câncer de mama ao polimorfismo Arg72Pro no gene *TP53*. Alguns trabalhos sugerem a forma Arg72 como alelo candidato de baixa penetrância para susceptibilidade no câncer de mama (Papadakis *et al.*, 2000; Buyru *et al.*, 2003; Damin *et al.*, 2006). Porém, o alelo Pro72 também tem sido associado com o risco elevado deste tipo de câncer (Dunning *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos que

arguem contra a contribuição do polimorfismo Arg72Pro na predisposição ao câncer de mama, têm sido reportados (Suspitsin *et al.*, 2003; Khadang *et al.*, 2007).

O polimorfismo Arg72Pro também tem sido associado com a resposta ao tratamento contra o câncer de mama. Bonafe e colaboradores (2003) sugerem que a retenção do alelo Arg72, em tecido tumoral de pacientes heterozigotos Arg72Pro com câncer de mama, estaria associada à redução de sobrevida livre de doença e sobrevida total. Em contraste, outros estudos sugerem que o alelo Pro72 estaria associado à sobrevivência reduzida em pacientes com câncer de mama (Sullivan *et al.*, 2004; Tommiska *et al.*, 2005; Toyama *et al.*, 2007). Xu e colaboradores (2005), verificaram que pacientes com câncer de mama com genótipo Pro/Pro poderiam ser menos sensíveis ao tratamento baseado em antraciclina do que aqueles com os genótipos Pro/Arg ou Arg/Arg sugerindo que a análise do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* poderia ser um simples marcador preditivo para selecionar aqueles pacientes com câncer de mama propensos a ter uma boa resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em antraciclina.

Mais recentemente, outro sítio polimórfico no códon 47 do mesmo éxon 4 do gene *TP53*, demonstrou que a proteína perde significativamente sua capacidade em induzir apoptose (Li *et al.*, 2005). O códon 47 codifica uma prolina (CCG) no gene *TP53* tipo selvagem, mas em um pequeno subgrupo de indivíduos pode codificar uma serina (TCG). Esta variante, que substitui o resíduo prolina necessário para o reconhecimento por quinases dirigidas por prolinas, é um substrato marcadamente pobre para a fosforilação na serina 46 pela p38 MAPK. São variadas as informações quanto à frequência do alelo Ser47 nas populações.

Felley-Bosco e colaboradores (1993) encontraram a presença do alelo Ser em < 5% de afro-americanos (n= 32) e em nenhum dos 69 caucasianos estudados. Em outro trabalho, realizado com 200 afro-americanos, encontrou-se uma frequência alélica de Ser47 de 1% (4/400) e nos 4 casos o alelo estaria atuando em *cis* com o alelo Pro72, sugerindo que ambos os polimorfismos estariam ligados (Li *et al.*, 2005). Em contraste, em um estudo realizado na população brasileira, foi descrita uma prevalência maior do alelo Ser47 (Leite *et al.*, 2006).

1.4. Polimorfismo do gene *MDR-1*

A glicoproteína P (gp-P), responsável pelo efluxo de droga das células, é uma proteína de transmembrana de 170 kDa membro da superfamília dos transportadores ABC (*ATP binding cassette*). O gene que codifica a gp-P é o *ABCB1*, também conhecido como *MDR1* (*multi-drug resistance*). O mesmo é constituído por 28 éxons e se localiza no cromossomo 7. A gp-P é um transportador completo composto por 12 segmentos de transmembrana dividido em dois domínios, cada um deles ligado a um domínio de união de ATP. A incorporação de um substrato ao sítio de ligação de alta afinidade resulta na hidrólise de ATP, causando uma mudança conformacional que traslada o substrato a um sítio de menor afinidade e logo o libera ao espaço extracelular ou camada externa da membrana (Sauna *et al.*, 2001).

Em 1976, a gp-P foi isolada pela primeira vez a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) resistentes a colchicina (Juliano e Ling, 1976). Quanto ao gene, este foi isolado a partir de células tumorais humanas resistentes a múltiplas

drogas, aproximadamente 10 anos depois (Chen *et al.*, 1986; Roninson *et al.*, 1986). Em células cancerosas, a gp-P é associada com o fenótipo MDR, mediando resistência a diversas drogas (Avendano e Menendez, 2002). Entre os substratos temos adriamicina, daunorrubicina, epirrubicina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, VP16, mitoxantrone, actinomicina D, além de inibidores da gp-P (Leonard *et al.*, 2003).

Hoffmeyer e colaboradores (2000) verificaram vários SNPs associados ao gene *MDR-1*. Doze das 15 mutações encontradas não tinham efeito sobre a seqüência protéica e somente o polimorfismo silencioso no éxon 26 (C3435T) teve uma correlação significativa com os níveis de expressão da glicoproteína P. Aqueles indivíduos homocigotos para o polimorfismo 3435T apresentaram a expressão desta glicoproteína significativamente reduzida. Por outro lado, a expressão da gp-P nas células tumorais, pode estar associado ao acúmulo nuclear da proteína p53 (Nguyen *et al.*, 1994; Linn *et al.*, 1997).

Interessantemente, a freqüência de C3435T varia significativamente entre os diferentes grupos étnicos. Nos caucasianos europeus, freqüências de 0,52-0,57 de C3435T foram reportadas. Na África, no entanto, a prevalência é muito mais baixa (0,17-0,27), enquanto em populações orientais têm sido reportados valores de 0,41-0,47 (Ameyaw *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Schaeffeler *et al.*, 2001; Bernal *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Kafka e colaboradores (2003) acharam correlação entre o genótipo TT e a resposta clínica completa em pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia neoadjuvante, mas não quando comparados com a resposta patológica completa, sugerindo que o polimorfismo C3435T poderia ajudar a

predizer o resultado individual nas abordagens terapêuticas com drogas que são afetadas pela glicoproteína P.

Atualmente, os dados descritos pela literatura não evidenciam com clareza a relação entre os polimorfismos nos genes TP53 e MDR-1 e sua influência na susceptibilidade e na resposta ao tratamento, o que demonstra a importância da análise desses polimorfismos no intuito de subclassificar grupos de risco e também determinar possíveis estratégias de tratamento mais individualizadas.

2. OBJETIVOS

Com base nos dados até aqui apresentados e também devido ao grande número de mulheres acometidas pelo câncer de mama, estudos que ajudem a compreender melhor a biologia desta doença, bem como a associação de polimorfismos que possam auxiliar no diagnóstico e no tratamento, são de fundamental importância.

Para esse fim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Determinar se as frequências alélicas e genotípicas para as variantes selvagem e polimórfica dos genótipos referentes aos polimorfismos Arg72Pro e Pro47Ser no gene *TP53* e C3435T no gene *MDR-1* são diferentes em pacientes com câncer de mama e em controles sadios.
2. Investigar a associação entre os polimorfismos funcionais nestes genes e a relação com os parâmetros: idade, etnia, idade ao primeiro parto, idade da menopausa e antecedentes de câncer de mama na família, nos grupos de pacientes e controles.
3. Avaliar a relação entre os polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* e as características clínico-patológicas, respostas clínica e patológica no tumor e nos linfonodos axilares em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante baseada em taxanos e antraciclinas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Caracterização da amostra

O estudo foi realizado em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama provenientes do ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, USP e em amostras de pacientes do mesmo ambulatório que não apresentavam a doença (ver Anexos, Tabela 4) e que receberam alta após a realização dos correspondentes exames mamográficos e/ou biópsias. Tanto o grupo das pacientes como o grupo controle foi composto por voluntárias na faixa etária de 25 a 70 anos de idade. A coleta de sangue de cada doadora foi feita logo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver Anexos). O projeto de pesquisa, assim como o termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas, FMRP-USP e posteriormente pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, processo N° 9106/2003) (ver Anexos).

A coleta do material foi realizada sob a responsabilidade de médicos e funcionários do Hospital das Clínicas, FMRP-USP. As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos de 5 ml contendo 6% de EDTA (*ethylene diamine tetra-acetic acid*).

A casuística do presente estudo é composta por um total de 236 indivíduos, sendo 116 pacientes com câncer de mama e 120 controles livres de doenças

oncológicas. Todas as amostras foram analisadas para a determinação da frequência de cada um dos polimorfismos dos genes estudados. No entanto, para avaliação da resposta só foram analisadas 81 das 116 amostras, correspondentes às pacientes que receberam e completaram o mesmo tratamento neoadjuvante, cujo regime se baseou em taxanos e antraciclinas (docetaxel 75 mg/m² e epirrubicina 50 mg/m², infusão IV, em um único dia, com intervalos de 21 dias, durante 3 ou 4 ciclos).

O tamanho do tumor foi definido como o maior diâmetro do tumor medido por exame físico e/ou mamografia e/ou ultrasonografia antes da terapia. Em todos os casos, uma biopsia incisional prévia ao tratamento foi realizada para confirmação do diagnóstico patológico e determinação imuno-histo-citoquímica (IHC). O estadiamento do tumor foi determinado de acordo com a classificação TNM (Tumor-Node-Metastasis) baseado no Sistema de Estadiamento de Câncer do Comitê da Junta Americana para o Câncer de Mama (AJCC) (Singletary *et al.*, 2002; Woodward *et al.*, 2003) (ver Anexos, Tabelas 1 e 2).

3.2. Extração e quantificação de DNA genômico

A extração do DNA foi feita a partir de amostras sangue periférico, utilizando o kit de extração WIZARD® (Genomic DNA Purification, Promega), conforme especificações do protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no aparelho GENEQuant (GE) e as

amostras de DNA foram estocadas em alíquotas à concentração de 100ng/ μ l, e mantido à -20°C até o uso.

3.3. Genotipagem e PCR - RFLP

Os polimorfismos foram analisados a partir de DNA genômico pela técnica de PCR - RFLP. Os fragmentos de interesse foram amplificados em termociclador e submetidos à eletroforese em gel de agarose convencional 2% (100 - 120 Volts) em cuba horizontal contendo tampão TBE 0,5x e corado com Brometo de Etídio (na concentração de 1mg/ml) para a comprovação do produto de amplificação, mediante a visualização do fragmento em transluminador ultravioleta. Após a digestão com as correspondentes enzimas de restrição para cada gene, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) 10% e 120 Volts em cuba vertical contendo tampão TBE 1x e corado com nitrato de prata.

Para identificar o peso das bandas foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 ou 25 pares de bases (pb). Em todos os casos, também foi utilizado um controle negativo (todos os reagentes, exceto o DNA), com o intuito de assegurar que não houve contaminação das amostras.

3.3.1. Detecção dos genótipos do gene *TP53*

Polimorfismo Arg72Pro: éxon 4

A amplificação do fragmento correspondente à região polimórfica do éxon 4 do gene *TP53* (Arg72Pro) foi feita baseada no método descrito por Liu *et al.* (2001) com modificações. Para reação de PCR (25 μ l) foram utilizadas as seguintes

condições: 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 200 μM de dNTPs (Invitrogen); 0,2 μM de cada um dos iniciadores (sense e antisense) (Invitrogen); 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 200 ng de DNA genômico; e água ultra-pura e estéril.

O ciclo de amplificação foi: 95°C/5min; 35 ciclos (95°C/1 min, 65°C/1 min, 72°C/1 min); 72°C/8 min; 4°C/∞.

As seqüências dos iniciadores utilizados foram:

F: 5'- TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA -3'

R: 5'- TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC -3'

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada utilizando: 10 μl de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB2), 6 U da enzima *Bst*UI (New England, Biolabs, ME), água ultra-pura estéril; volume final de 25 μL. A incubação foi à 60°C *overnight*, em banho térmico.

O produto amplificado do gene *TP53* gera um fragmento de 199 pb e seu polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio de restrição para a enzima *Bst*UI (CG[^]CG). A presença do sítio de corte para *Bst*UI em ambos os alelos é representada pelo genótipo tipo selvagem (Arg/Arg), que apresenta dois fragmentos: 113 pb e 86 pb. A ausência do sítio de corte em ambos os alelos representa o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (Pro/Pro), o qual é caracterizado pela presença de um fragmento de 199 pb. Um alelo polimórfico e

outro normal caracterizam o genótipo heterozigoto (Pro/Arg), mostrando os três padrões de bandas: 199 pb, 113 pb e 86 pb.

Polimorfismo Pro472Ser: éxon 4

A amplificação do fragmento correspondente à região polimórfica Ser47Pro do gene *TP53* foi a mesma utilizada para o polimorfismo Arg72Pro, descrita anteriormente.

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada utilizando: 10 µl de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB2), 10 U da enzima *MspI* (New England Biolabs, ME), água ultra-pura estéril; volume final de 25 µL. A incubação foi à 37°C *overnight*, em banho térmico.

O produto amplificado do gene *TP53* gera um fragmento de 199 pb e seu polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio de restrição para a enzima *MspI* (C[^]CGG). O fragmento amplificado apresenta dois sítios de corte para *MspI*, um deles constitutivo, gerando uma banda de 57 pb e o outro polimórfico representada pelo alelo tipo selvagem Pro47. Portanto, o genótipo homozigoto selvagem (Pro/Pro) apresenta três fragmentos: 105 pb, 57 pb e 37 pb. A ausência de sítio de corte na posição 47 é representada pelo alelo polimórfico Ser47, de modo que o genótipo homozigoto (Ser/Ser) é caracterizado pela presença de dois fragmentos de 142 pb e 57 pb. Um alelo polimórfico e outro normal caracterizam o genótipo heterozigoto (Pro/Ser), mostrando um padrão de 4 bandas (142 pb, 105 pb, 57 pb e 37 pb) após o tratamento com a enzima.

3.3.2. Detecção dos genótipos do gene *MDR-1*

Polimorfismo C3435T: éxon 26

A amplificação do fragmento correspondente à região polimórfica do éxon 26 do gene *MDR-1* (C3435T) foi feita baseada no método de Cascorbi e colaboradores (2001) com modificações. Para reação de PCR (25 µl) foram utilizadas as seguintes condições: 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 200 µM de dNTPs (Invitrogen); 0,075 µM de cada um dos iniciadores (sense e antisense) (Invitrogen); 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 200 ng de DNA genômico; e água ultra-pura e estéril.

O ciclo de amplificação foi: 94°C/2min; 35 ciclos (94°C/30seg, 60°C/45 seg, 72°C/45 seg); 72°C/10 min; 4°C/∞.

As seqüências dos iniciadores utilizados foram:

F: 5' TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG 3'

R: 5' AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC 3'

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada utilizando 10 µl de produto de amplificação, tampão de reação 1X (NEB3), 5 U da enzima *MboI* (New England BioLabs), água ultra-pura estéril; volume final de 25 µL. A incubação foi à 37°C *overnight*, em banho térmico.

O produto amplificado do gene *MDR1* gera um fragmento de 197 pb. O polimorfismo que caracteriza este gene é detectado pela presença ou ausência do sítio de restrição para a enzima *MboI* (^GATC). A presença do sítio de corte para *MboI* em ambos os alelos origina o genótipo tipo selvagem (CC), que apresenta

dois fragmentos: 158 pb e 39 pb. A ausência do sítio de corte em ambos os alelos representa o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (TT), o qual é caracterizado pelo fragmento de 197 pb. Um alelo polimórfico e outro normal caracterizam o genótipo heterozigoto (CT), mostrando os três padrões de bandas: 197 pb, 158 pb e 39 pb.

3.4. Estimativa da resposta

Somente as pacientes com o tratamento completo de quimioterapia neoadjuvante foram analisadas para estimativa da resposta. A resposta clínica e patológica foi avaliada após a cirurgia, a qual foi realizada não mais do que 4 semanas após o último ciclo, baseada na análise macro e microscópica, respectivamente. Esta análise foi realizada pelo Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, como parte da rotina do Ambulatório de Mastologia. A classificação utilizada foi baseada no sistema conhecido como RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) (Therasse *et al.*, 2000). A resposta clínica, medida e avaliada unidimensionalmente, foi classificada como **resposta completa (RC)**, quando há redução do tumor em 100%; **resposta parcial (RP)**, com redução do tumor $\geq 30\%$; **doença estável (DE)**, quando não é considerado RP nem progressão; e **progressão da doença (PD)**, quando há aumento $\geq 20\%$ e não houve documentação prévia de RC, RP ou DE. As pacientes foram agrupadas em duas classes para sua posterior análise: o grupo de **resposta objetiva (RO)**, no qual todas as classificações RC e RP foram designadas e, o grupo de **não resposta (NR)**, correspondente a todas as pacientes classificadas

como DE e PD. Para a resposta patológica, as categorias adotadas foram: **resposta patológica completa (RPC)**, definida como a não evidência de doença residual invasiva na mama ou linfonodos; **doença residual mínima (DRM)**, correspondente a todas as pacientes com tumores invasivos na mama medindo $\leq 1\text{cm}$ e linfonodos negativos; e **doença residual extensa (DRE)**, definida como tumores invasivos na mama medindo $>1\text{cm}$ ou qualquer linfonodo na axila independente do tamanho do tumor residual na mama (Zhang *et al.*, 2003).

3.5. Análise estatística

A frequência dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR1* foi calculada para a amostra total de 116 pacientes com câncer de mama e para os 120 indivíduos controle. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui Quadrado ou pelo teste exato de Fisher (bi-caudal) (Agresti, 1992), quando necessário. O mesmo foi aplicado para verificar a significância estatística das associações quando comparadas com as frequências de cada genótipo e alelos estudados na amostra total de pacientes e controles. Foi também utilizado para determinar a associação entre os genótipos e a resposta à quimioterapia neoadjuvante. O nível de probabilidade (P) menor ou igual a 0,05 foi utilizado como critério de significância. A “odds ratio” (OR) (razões de probabilidade) e o intervalo de confiança (IC) de 95%, de acordo com Kleinbaum *et al.* (1982), foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação.

Todas as análises foram realizadas pelo software InStat (GraphPad InStat, versão 3.0, GraphPad Software) e pelo software SigmaStat 1.0 (Jandel Scientific).

A assessoria estatística foi prestada pelo Prof. José Carlos Barbosa da Universidade Estadual de São Paulo em Jaboticabal (UNESP), e pela Profa. Claudia Cristina Paro de Paz da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP).

4. RESULTADOS

4.1. Detecção dos polimorfismos

Entre os polimorfismos no gene *TP53*, dois são caracterizados pela presença ou ausência de sítios de corte para as enzimas *Bst*UI e *Msp*I nos códons 72 e 47, respectivamente. A partir do mesmo produto de amplificação (199 pb) foram obtidos os padrões de bandas descritos a seguir. No polimorfismo Arg72Pro, o genótipo tipo selvagem (Arg/Arg), apresenta dois fragmentos, 113 pb e 86 pb; o genótipo heterozigoto (Arg/Pro), apresenta três fragmentos: 199 pb, 113 pb e 86 pb e finalmente o homozigoto polimórfico (Pro/Pro) apresenta apenas um fragmento de 199 pb (Figura 3).

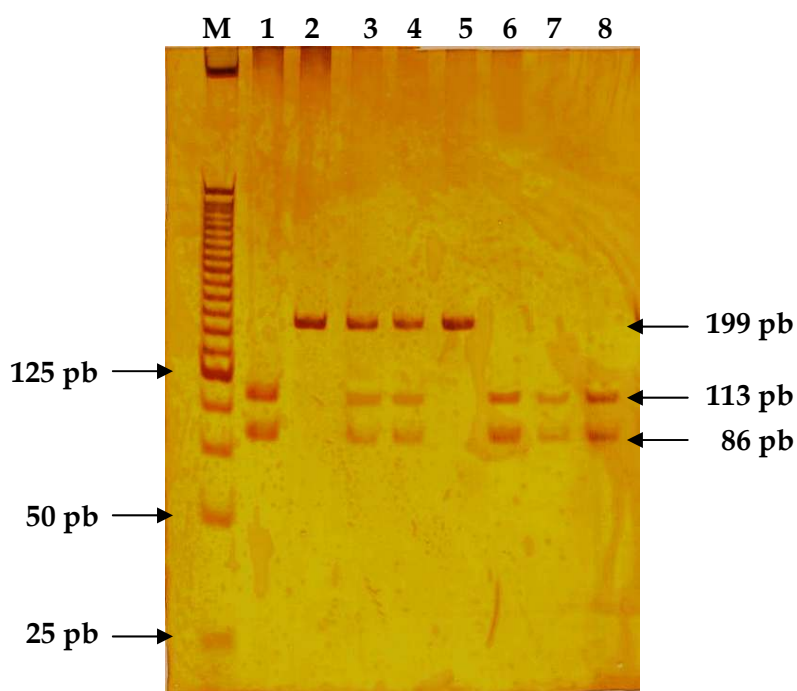


Figura 3. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo Arg/Pro no éxon 4 do gene *TP53*, digeridos com a enzima *Bst*UI. M = marcador de peso molecular (25 pb). Linhas 1, 6, 7 e 8 : homozigoto para o alelo selvagem (Arg/Arg). Linhas 3 e 4 : heterozigoto (Arg/Pro). Linhas 2 e 5: homozigoto para o alelo polimórfico (Pro/Pro). Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

No caso do polimorfismo Pro47Ser, o genótipo homozigoto polimórfico (Ser/Ser) apresenta duas bandas: 142 pb e 57 pb, uma vez que possui um sítio de corte constitutivo o qual serve como controle positivo da digestão. O genótipo homozigoto selvagem (Pro/Pro) apresenta três bandas (105 pb, 57 pb e 37 pb) e o genótipo heterozigoto apresenta quatro bandas: 142 pb, 105 pb, 57 pb e 37 pb. A Figura 4 mostra o polimorfismo Pro47Ser.

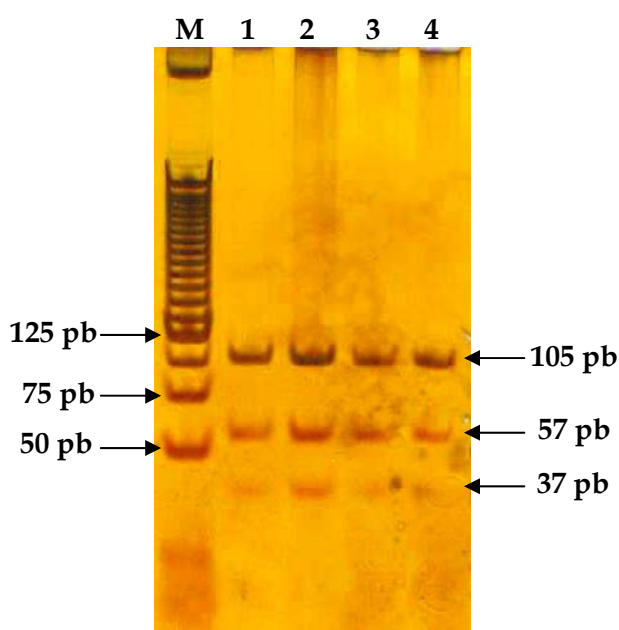


Figura 4. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo Pro/Ser no códon 47 no éxon 4 do gene *TP53*, digeridos com a enzima *MspI*. M = marcador de peso molecular (25 pb). Linhas 1, 2, 3 e 4: homozigoto para o alelo selvagem (Pro/Pro). Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

A figura 5 representa o polimorfismo C3435T para o gene *MDR-1*. A amplificação gera um produto de 197 pb. O homozigoto selvagem apresenta o sítio de corte para a enzima *MboI*, sendo caracterizado por dois fragmentos: 158 pb e 39 pb. O homozigoto polimórfico não possui sítio de corte para a enzima, apresentando um único fragmento de 197 pb, enquanto o genótipo heterozigoto apresenta três bandas: 197 pb, 158 pb e 39 pb.

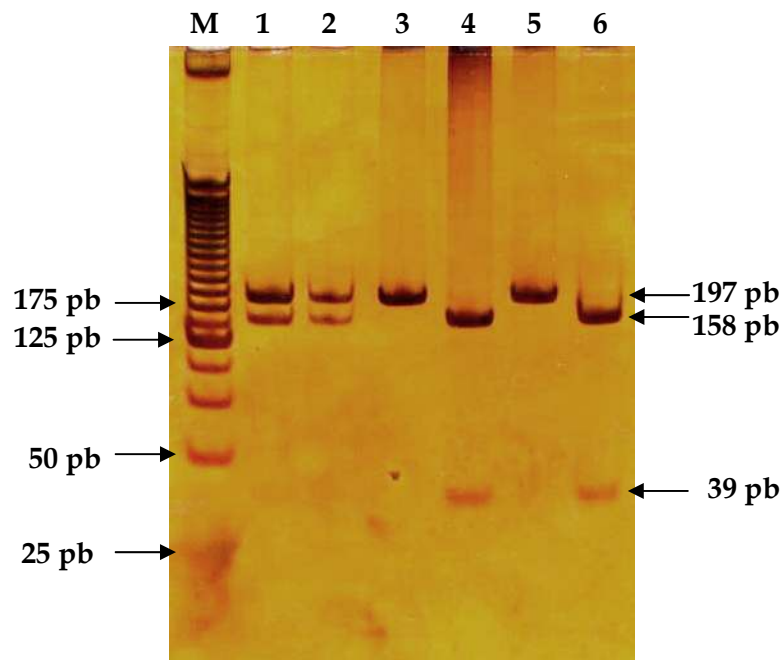


Figura 5. PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo C→T na posição 3435 no éxon 26 do gene *MDR-1*, digeridos com a enzima *MboI*. M = marcador de peso molecular (25 pb). Linhas 4 e 6: homocigoto para o alelo selvagem (CC). Linhas 1 e 2: heterocigoto (CT). Linhas 3 e 5: homocigoto para o alelo polimórfico (TT).

4.2. Distribuições dos genótipos dos genes *TP53* e *MDR-1*

As distribuições das frequências genotípicas e alélicas para os genes *TP53* (polimorfismos Arg72Pro e Pro47Ser) e *MDR-1* (polimorfismo C3435T), para a amostra total de pacientes com câncer de mama (CM) e controles livres de neoplasias estão apresentadas na Tabela 1.

Quando foi analisada a frequência do polimorfismo para o gene *TP53* - Arg72Pro na amostra total de pacientes (n = 116) e controles (n = 120), o genótipo homocigoto para o alelo polimórfico (Pro/Pro) foi detectado em 13,8% das pacientes com CM e em 15,8% dos controles. Para os genótipos heterocigoto (Arg/Pro) e homocigoto selvagem (Arg/Arg) as frequências também foram

semelhantes entre pacientes (41,4% e 39,2%) e controles (44,8%; 45%), respectivamente. Quando calculadas as frequências alélicas para a variante polimórfica (Pro72) os resultados foram: 0,345 para as pacientes com CM e 0,354 para os controles (Tabela 1). No presente estudo, as distribuições das frequências fenotípicas observadas para o polimorfismo Arg72Pro no gene *TP53* não demonstraram um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o polimorfismo *TP53* - Pro47Ser não foram observados indivíduos homocigotos para o alelo polimórfico (Ser/Ser) nem heterocigotos (Pro/Ser) no total da amostra. Por este motivo o polimorfismo não foi submetido à análise estatística no nosso estudo. Portanto, na amostra de 236 mulheres analisadas, houve uma frequência de 100% para o genótipo selvagem (Pro/Pro).

Em relação ao polimorfismo do gene *MDR-1*, C3435T, 12,9% das pacientes com CM e 15,8% dos controles apresentaram o genótipo homocigoto para o alelo polimórfico (TT). Para o genótipo heterocigoto (CT) verificou-se que a prevalência deste também não diferiu entre os dois grupos estudados (49,2%, pacientes CM; 43,4%, controles). No caso do genótipo selvagem, as frequências encontradas para pacientes com CM (37,9%) e controles (40,8%) também foram similares. As frequências alélicas foram idênticas, tanto para pacientes quanto para os controles e os genótipos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* em pacientes e controles.

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
		Pacientes	Controles		
<i>TP53</i> (códon 72)	Arg/Arg	52/116 (44,8)	54/120 (45,0)	1,0 (referência)	-
	Arg/Pro	48/116 (41,4)	47/120 (39,2)	0,94 (0,54 - 1,64)	0,8880
	Pro/Pro	16/116 (13,8)	19/120 (15,8)	1,14 (0,53 - 2,46)	0,8457
	Arg/Pro + Pro/Pro	64/116 (55,2)	66/120 (55,0)	0,99 (0,59 - 1,65)	1,0000
	Alelos				
	Arg	0,655	0,646	-	0,8474
	Pro	0,345	0,354	-	
<i>TP53</i> (códon 72)	Pro/Pro	116 (100)	120 (100)	-	-
	Pro/Ser	-	-	-	-
	Ser/Ser	-	-	-	-
	Alelos				
	Pro	1,0	1,0	-	-
	Ser	-	-	-	
<i>MDR-1</i> (C3435T)	CC	44/116 (37,9)	49/120 (40,8)	1,0 (referência)	-
	CT	57/116 (49,2)	52/120 (43,4)	1,22 (0,70 - 2,12)	0,5724
	TT	15/116 (12,9)	19/120 (15,8)	0,87 (0,39 - 1,93)	0,8416
	CT + TT	72/116 (62,1)	71/120 (59,2)	0,88 (0,52 - 1,49)	0,6904
	Alelos				
	C	0,625	0,625	-	1,0000
	T	0,375	0,375	-	

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

4.3. Distribuições dos genótipos dos genes *TP53* e *MDR-1* em relação à idade, etnia e fatores de risco para o câncer de mama.

As frequências dos genótipos *TP53* e *MDR-1*, para as pacientes com CM e controles também foram correlacionadas com idade (≤ 50 anos; > 50 anos), etnia (brancos; não brancos), idade ao primeiro parto (≤ 30 anos; > 30 anos), idade da menopausa (< 55 anos; ≥ 55 anos) e antecedentes de câncer de mama na família (parentes em primeiro grau).

A média de idade para as pacientes foi de 50,2 e para as controles foi de 45,7. Cinquenta e sete pacientes com CM (49,1%) tinham idade ≤ 50 anos, enquanto nos controles esse número foi de 88 mulheres (73,3%). As frequências dos genótipos do gene *TP53* foram 43,8% (Arg/Arg), 40,4% (Arg/Pro) e 15,8% (Pro/Pro) no grupo de pacientes com CM ≤ 50 anos e, 45,8%, 42,4% e 11,8% nas pacientes com CM acima de 50 anos, respectivamente. Para o grupo controle, a distribuição dos genótipos foi 42,1% (Arg/Arg) 40,9% (Arg/Pro) e 17,0% (Pro/Pro) em mulheres ≤ 50 anos e, 53,1%, 34,4% e 12,5% em mulheres acima de 50 anos, respectivamente, onde não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Entretanto, para o polimorfismo *MDR-1*, observou-se, em relação ao genótipo homozigoto polimórfico (TT), que o grupo dos controles com idade maior que 50 anos apresentou uma frequência maior desse genótipo em comparação com seu respectivo grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0213$), verificando-se uma prevalência 3,8 vezes maior do genótipo TT no grupo controle com idade maior que 50 anos (OR= 3,83; 95% IC=

1,24 - 11,80). Este resultado sugere uma associação significativa do genótipo *MDR-1* (TT) com o risco reduzido de CM em mulheres com idade acima de 50 anos (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* em pacientes e controles de acordo com a idade.

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	≤ 50 anos	>50 anos		
<i>TP53</i> (Arg/Arg)				
Pacientes	25/57 (43,8)	27/59 (45,8)	1,0 (referência)	-
Controles	37/88 (42,1)	17/32 (53,1)	1,0 (referência)	-
<i>TP53</i> (Arg/Pro)				
Pacientes	23/57 (40,4)	25/59 (42,4)	1,00 (0,45-2,20)	1,0000
Controles	36/88 (40,9)	11/32 (34,4)	0,66 (0,27-1,61)	0,3839
<i>TP53</i> (Pro/Pro)				
Pacientes	9/57 (15,8)	7/59 (11,8)	0,72 (0,23-2,22)	0,7757
Controles	15/88 (17,0)	4/32 (12,5)	0,58 (0,16-2,01)	0,5574
<i>MDR-1</i> (CC)				
Pacientes	19/57 (33,4)	25/59 (42,4)	1,0 (referência)	-
Controles	38/88 (43,2)	11/32 (34,4)	1,0 (referência)	-
<i>MDR-1</i> (CT)				
Pacientes	32/57 (56,1)	25/59 (42,4)	0,59 (0,26-1,31)	0,2314
Controles	41/88 (46,6)	11/32 (34,4)	0,92 (0,36-2,38)	1,0000
<i>MDR-1</i> (TT)				
Pacientes	6/57 (10,5)	9/59 (15,2)	1,14 (0,34-3,75)	1,0000
Controles	9/88 (10,2)	10/32 (31,2)	3,83 (1,24-11,80)	0,0213*

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.
* estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Quanto às etnias, os grupos foram divididos em brancos e não brancos, tanto para as pacientes com CM quanto para os controles, sendo que 21,6% das pacientes e 13,4% dos controles foram considerados “não brancos” (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* em pacientes e controles de acordo com a etnia.

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Brancos	Não brancos		
<i>TP53 (Arg/Arg)</i>				
Pacientes	40/91 (44,0)	12/25 (48,0)	1,0 (referência)	-
Controles	51/104 (49,0)	3/16 (18,7)	1,0 (referência)	-
<i>TP53 (Arg/Pro)</i>				
Pacientes	41/91 (45,0)	7/25 (28,0)	0,56 (0,20-1,59)	0,3170
Controles	39/104 (37,5)	8/16 (50,0)	3,48 (0,86-14,01)	0,1071
<i>TP53 (Pro/Pro)</i>				
Pacientes	10/91 (11,0)	6/25 (24,0)	2,00 (0,60-6,64)	0,3324
Controles	14/104 (13,5)	5/16 (31,3)	6,07 (1,29-28,57)	0,0246*
<i>MDR-1 (CC)</i>				
Pacientes	31/91 (34,1)	13/25 (52,0)	1,0 (referência)	-
Controles	45/104 (43,3)	4/16 (25,0)	1,0 (referência)	-
<i>MDR-1 (CT)</i>				
Pacientes	46/91 (50,5)	11/25 (44,0)	0,57 (0,22-1,43)	0,2480
Controles	41/104 (39,4)	11/16 (68,8)	3,01 (0,89-10,22)	0,0933
<i>MDR-1 (TT)</i>				
Pacientes	14/91 (15,4)	1/25 (4,0)	0,17 (0,02-1,43)	0,0896
Controles	18/104 (17,3)	1/16 (6,2)	0,62 (0,86-14,01)	1,0000

OR = “odds ratio”; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

* estatisticamente significativo (p<0,05).

No caso do genótipo homozigoto para o polimorfismo do gene *TP53*, Pro/Pro, detectou - se uma frequência aumentada deste genótipo nos controles do grupo não branco (31,3%), conferindo um efeito protetor (OR= 6,07 ; 95% IC= 1,29-28,57) para o desenvolvimento de CM na população feminina não branca ($p=0,0246$) (Tabela 3).

Considerando as pacientes com CM para o gene *MDR-1*, detectou-se a presença diminuída do genótipo homozigoto polimórfico (TT) no grupo de não brancos (4%). Apesar de no grupo controle se observar uma frequência aumentada do genótipo heterozigoto (CT) também para o grupo de não brancos (68,8%), essas variações ($p= 0,08$ e $p= 0,09$, respectivamente) não foram estatisticamente significativas (Tabela 3).

Para a avaliação da distribuição dos genótipos em relação à idade ao primeiro parto, não foram consideradas na análise mulheres ≤ 30 anos nuligestas que ainda poderiam ter seu primeiro parto antes dessa idade. Mulheres nuligestas maiores de 30 anos foram incluídas na análise, dado que pertencem ao grupo de risco para câncer de mama.

Do total analisado, 77% ($n=113$) das pacientes com CM tiveram seu primeiro filho antes da idade considerada de risco, enquanto 82,3% ($n= 113$) dos controles também tiveram seu primeiro filho antes dos 30 anos. Comparando o grupo das pacientes com CM (com idade ao primeiro parto maior que 30 anos) para o genótipo polimórfico Pro/Pro do gene *TP53* em relação ao genótipo homozigoto selvagem, observou-se uma frequência diminuída (7,7%), mas não houve diferença estatisticamente significativa. No caso do gene *MDR-1*, este

mesmo grupo (pacientes CM; >30 anos) apresentou uma frequência aumentada do genótipo heterozigoto CT (61,5%), mas a diferença também não foi significativa (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* em pacientes e controles de acordo com a idade ao primeiro parto.

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	≤ 30 anos	>30 anos		
<i>TP53 (Arg/Arg)</i>				
Pacientes	37/87 (42,5)	14/26 (53,8)	1,0 (referência)	-
Controles	43/93 (46,2)	8/20 (40,0)	1,0 (referência)	-
<i>TP53 (Arg/Pro)</i>				
Pacientes	37/87 (42,5)	10/26 (38,5)	0,71(0,28-1,81)	0,4929
Controles	35/93 (37,6)	8/20 (40,0)	1,22 (0,41-3,60)	0,7864
<i>TP53 (Pro/Pro)</i>				
Pacientes	13/87 (15,0)	2/26 (7,7)	0,40 (0,30-2,58)	0,3262
Controles	15/93 (16,1)	4/20 (20,0)	1,43 (0,37-5,45)	0,7229
<i>MDR-1 (CC)</i>				
Pacientes	35/87 (40,2)	7/26 (27,0)	1,0 (referência)	-
Controles	37/93 (39,8)	8/20 (40,0)	1,0 (referência)	-
<i>MDR-1 (CT)</i>				
Pacientes	41/87 (47,1)	16/26 (61,5)	1,95 (0,72-5,28)	0,2320
Controles	42/93 (45,2)	8/20 (40,0)	0,88 (0,30-2,58)	1,0000
<i>MDR-1 (TT)</i>				
Pacientes	11/87 (12,7)	3/26 (11,5)	1,36 (0,30-6,19)	0,6984
Controles	14/93 (15,0)	4/20 (20,0)	1,32 (0,34-5,09)	0,7290

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

Quanto à análise da característica menopausa, a valor de corte considerado para análise foi baseada na idade considerada de risco, sendo que foram excluídas

da análise aquelas mulheres com menos de 55 anos que ainda poderiam entrar na menopausa antes desta idade. Portanto o número de casos analisados foi de 59 para o grupo das pacientes com CM e de 44 para o grupo controle. Dentre as mulheres que tiveram a menopausa com idade ≥ 55 anos, 81,8% foram pacientes com CM e 18,2% pertenciam ao grupo controle. Dentre as mulheres com idade inferior a 55 anos, 54,3% foram do grupo de pacientes com CM e 45,7% do grupo controle (Tabela 5).

Na análise do polimorfismo do gene *TP53*, foi observada uma diminuição na frequência do genótipo heterozigoto no grupo controle que apresentou menopausa com idade inferior a 55 anos (28,6%) em comparação ao respectivo grupo de pacientes com CM (40%); entretanto, não foram encontrados indivíduos controles que apresentaram menopausa com idade ≥ 55 anos para o genótipo polimórfico Pro/Pro. No caso do gene *MDR-1*, não foram observados indivíduos controles com idade acima de 55 anos para a menopausa com relação ao genótipo homozigoto selvagem CC. Por outro lado, o genótipo polimórfico TT apresentou uma frequência diminuída para o grupo de pacientes com CM que apresentou menopausa antes dos 55 anos (14%) em relação aos controles (28,6%) (Tabela 5).

Para a determinação da relação dos antecedentes familiares e os respectivos genótipos foram considerados como positivos somente os casos de câncer de mama em parentes em primeiro grau (mãe ou irmã).

Tabela 5: Distribuição dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* em pacientes e controles de acordo com a idade da menopausa.

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	< 55 anos	≥ 55 anos		
<i>TP53 (Arg/Arg)</i>				
Pacientes	24/50 (48,0)	3/9 (33,3)	1,0 (referência)	-
Controles	23/42 (54,7)	1/2 (50,0)	1,0 (referência)	-
<i>TP53 (Arg/Pro)</i>				
Pacientes	20/50 (40,0)	5/9 (55,6)	2,00 (0,42-9,42)	0,4583
Controles	12/42 (28,6)	1/2 (50,0)	1,91 (0,10-33,43)	1,0000
<i>TP53 (Pro/Pro)</i>				
Pacientes	6/50 (12,0)	1/9 (11,1)	1,33 (0,11-15,20)	1,0000
Controles	7/42 (16,7)	0/2 (0,0)	1,04 (0,03-28,46)	1,0000
<i>MDR-1 (CC)</i>				
Pacientes	20/50 (40,0)	2/9 (22,2)	1,0 (referência)	-
Controles	14/42 (33,3)	0/2 (0,0)	1,0 (referência)	-
<i>MDR-1 (CT)</i>				
Pacientes	23/50 (46,0)	5/9 (55,6)	2,17 (0,39-12,46)	0,4444
Controles	16/42 (38,1)	1/2 (50,0)	2,63 (0,09-69,94)	1,0000
<i>MDR-1 (TT)</i>				
Pacientes	7/50 (14,0)	2/9 (22,2)	2,85 (0,33-24,31)	0,5595
Controles	12/42 (28,6)	1/2 (50,0)	3,48 (0,12-93,37)	0,4815

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

No total, 7,8% das pacientes com CM tinham histórico de pelo menos um parente com câncer de mama, enquanto o valor para o grupo controle foi 9,2%. No caso do gene *TP53*, avaliando o grupo com histórico familiar de CM, não foram observados indivíduos com genótipo homocigoto polimórfico Pro/Pro. Também não foram observados pacientes homocigotos para o genótipo polimórfico TT do gene *MDR-1* no grupo com histórico de câncer de mama. Os genótipos

heterozigotos e os genótipos homozigotos selvagens para ambos os genes (*TP53* e *MDR-1*) apresentaram frequências similares (Tabela 6).

TABELA 6: Distribuição das pacientes e controles, em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1*, de acordo com a existência de antecedentes de câncer de mama (mãe ou irmã).

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	sim	não		
<i>TP53 (Arg/Arg)</i>				
Pacientes	5/9 (55,5)	47/107 (43,9)	1,0 (referência)	-
Controles	7/11 (63,6)	47/109 (43,2)	1,0 (referência)	-
<i>TP53 (Arg/Pro)</i>				
Pacientes	4/9 (44,5)	44/107 (41,2)	1,17 (0,29-4,64)	1,0000
Controles	4/11 (36,4)	43/109 (39,4)	1,60 (0,43-5,85)	0,5371
<i>TP53 (Pro/Pro)</i>				
Pacientes	0/9 (0,0)	16/107 (14,9)	3,82 (0,20-72,96)	0,3301
Controles	0/11 (0,0)	19/109 (17,4)	6,15 (0,33-113,2)	0,1788
<i>MDR-1 (CC)</i>				
Pacientes	5/9 (55,5)	39/107 (36,5)	1,0 (referência)	-
Controles	5/11 (45,5)	44/109 (40,4)	1,0 (referência)	-
<i>MDR-1 (CT)</i>				
Pacientes	4/9 (44,5)	53/107 (49,5)	1,69 (0,42-6,74)	0,4977
Controles	5/11 (45,5)	47/109 (43,1)	1,06 (0,28-3,94)	1,0000
<i>MDR-1 (TT)</i>				
Pacientes	0/9 (0,0)	15/107 (14,0)	4,13 (0,22-82,86)	0,3155
Controles	1/11 (9,0)	18/109 (16,5)	0,90 (0,09-8,85)	1,0000

OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste Exato de Fisher.

4.4. Distribuições dos genótipos nos genes *TP53* e *MDR-1* de acordo com as características das pacientes antes do tratamento neoadjuvante.

Para estimar a influência dos polimorfismos em relação ao tratamento neoadjuvante foram avaliadas 81 pacientes. Todas elas foram submetidas ao mesmo tratamento neoadjuvante (docetaxel 75 mg/m² e epirrubicina 50 mg/m², infusão IV, em um único dia; com intervalos de 21 dias; durante 3 ou 4 ciclos). A média para o número de ciclos para as 81 pacientes foi de 3,45 ciclos. As características histo-patológicas (histologia, grau histológico) e IHC (receptor de estrógeno e progesterona, p53 mutante e erbB2) das pacientes foram determinadas antes do início do correspondente tratamento. Nas tabelas 7 e 8, observa-se a distribuição dos genótipos dos genes *TP53* e *MDR-1*, respectivamente, com relação às variáveis analisadas.

A distribuição dos genótipos nas 81 pacientes analisadas foi a seguinte: Arg/Arg (43,2%), Arg/Pro (45,7%) e Pro/Pro (11,1%) para o gene *TP53*; e CC (39,5%), CT (46,9%) e TT (13,6%) para o gene *MDR-1*.

A média de idade foi de 49,8 anos, sendo que 50,6% tinham idade \leq 50 anos. As frequências observadas para cada genótipo foram similares em ambos os genes.

Quanto ao tamanho do tumor, 56,8% dos pacientes apresentaram tumor maior que 5 cm e entre os tumores \leq 5 cm, somente 6 apresentaram tamanho \leq 3cm. Para determinar o estadio do tumor, além do tamanho é considerado o número de linfonodos axilares palpáveis. Para a classificação foi utilizado o sistema da AJCC para o estadiamento do câncer de mama (ver Anexos, Tabelas 1 e

2). A maioria dos tumores encontrava-se em estadios mais avançados da doença, onde 50,6% eram estadio III (A ou B) e os 49,4% restantes foram classificados como estadio II (A e B). Quanto à distribuição das frequências em relação ao grau para cada genótipo, no caso do gene *TP53* foram similares e, no gene *MDR-1*, observou-se uma frequência diminuída do genótipo CC para o estadio II quando comparado com os genótipos CT e TT, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,223$).

O câncer do tipo ductal foi o mais frequente representando 82,7% dos tumores. Na categoria “outros” foram incluídos alguns casos de câncer do tipo ductal e lobular quando associados a outros tipos celulares no mesmo tumor. Na distribuição dos genótipos para o gene *TP53*, o genótipo heterozigoto teve a sua frequência um pouco aumentada na categoria “outros” (18,9%) em comparação aos outros tipos histológicos, mas essa diferença não foi significativa ($p= 0,383$). Na análise do gene *MDR-1*, foi observado um aumento das frequências para o genótipo heterozigoto na mesma categoria (18,4%) e do genótipo homozigoto polimórfico para o tipo lobular (18,2%) em comparação aos demais grupos, mas esta diferença também não foi estatisticamente significativa ($p= 0,067$).

O grau histológico dos tumores foi baseado na classificação de Scarff, Bloom e Richardson (1957), modificada por Elston e Ellis (1991), o qual determina o grau de diferenciação das células neoplásicas, considerando formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (ver Anexos, Tabela 3). O grau II (moderadamente diferenciado) foi o mais comum entre as amostras analisadas (56,2%), mostrando que 18% apresentaram grau I (bem diferenciado) e 26,4% grau

III (pouco diferenciado), este último considerado o tipo mais agressivo. Em relação à variante polimórfica Pro/Pro para o gene *TP53*, observaram-se frequências aumentadas nos graus I e II (37,5 % para cada um deles). Em contraste, para a variante polimórfica TT do gene *MDR-1*, a frequência aumentada foi encontrada para o grau III (40,0%), enquanto para os outros genótipos, as frequências foram similares para os dois genes ($p= 0,526$) e ($p= 0,446$), respectivamente.

A distribuição dos genótipos em relação à condição pré- ou pós-menopausa das pacientes (55,5% e 44,5%, respectivamente) foi homogênea tanto para o gene *TP53* quanto para o gene *MDR-1*.

Os dados de IHC revelaram que 63,3% e 48,1% das pacientes foram positivas para os receptores de estrógeno e progesterona, respectivamente. Apesar do polimorfismo Pro/Pro para o gene *TP53* apresentar uma frequência aumentada para receptor de estrógeno positivo (88,9%), não houve diferença significativa; quanto ao receptor progesterona positivo as frequências foram similares para os três genótipos. No caso do gene *MDR-1*, a distribuição dos genótipos foi uniforme para os dois tipos de receptores hormonais.

Tabela 7. Distribuição das variáveis das 81 pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante e a relação entre o polimorfismo Arg72Pro do gene *TP53* e as características pré-tratamento.

Variável	n	%	Arg/Arg, n (%)	Arg/Pro, n (%)	Pro/Pro, n (%)	P
Idade						
≤ 50 anos	41	50,6	16 (45,7)	21 (56,7)	4 (44,4)	0,663
> 50 anos	40	49,4	19 (54,3)	16 (43,3)	5 (55,6)	
Tamanho do tumor						
≤ 5 cm	35	43,2	16 (45,7)	15 (40,5)	4 (44,4)	0,948
> 5 cm	46	56,8	19 (54,3)	22 (59,5)	5 (55,6)	
Estádio clínico						
II (A e B)	40	49,4	19 (54,3)	17 (45,9)	4 (44,4)	0,737
III (A e B)	41	50,6	16 (45,7)	20 (54,1)	5 (55,6)	
Histologia						
Ductal	67	82,7	30 (85,7)	29 (78,4)	8 (88,9)	0,383
Lobular	4	5,0	3 (8,6)	1 (2,7)	0 (---)	
Outros	10	12,3	2 (5,7)	7 (18,9)	1 (11,1)	
Grau histopatológico						
I	13	18,0	6 (20,0)	4 (11,8)	3 (37,5)	0,526
II	40	55,6	16 (53,3)	21 (61,7)	3 (37,5)	
III	19	26,4	8 (26,7)	9 (26,5)	2 (25,0)	
Não determinado	9	-				
Condição menopáusic						
Pré-menopausa	45	55,5	18 (51,4)	22 (59,5)	5 (55,6)	0,857
Pós-menopausa	36	44,5	17 (48,6)	15 (40,5)	4 (44,4)	
Receptor de estrogênio						
Positivo	50	63,3	19 (54,3)	23 (65,7)	8 (88,9)	0,183
Negativo	29	36,7	16 (45,7)	12 (34,3)	1 (11,1)	
Não determinado	2	-				
Receptor de progesterona						
Positivo	38	48,1	16 (45,7)	16 (45,7)	6 (66,7)	0,508
Negativo	41	51,9	19 (54,3)	19 (54,3)	3 (33,3)	
Não determinado	2	-				
p53						
Positivo	29	51,8	16 (57,1)	12 (54,5)	1 (16,6)	0,221
Negativo	27	48,2	12 (42,9)	10 (45,5)	5 (83,4)	
Não determinado	25	-				
erbB2						
Positivo	17	27,4	7 (24,1)	8 (29,6)	2 (33,3)	0,773
Negativo	45	72,6	22 (75,9)	19 (70,4)	4 (66,7)	
Não determinado	19	-				

Tabela 8. Distribuição das variáveis das 81 pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante e a relação entre o polimorfismo C3435T do gene *MDR-1* e as características pré-tratamento.

Variável	n	%	CC, n (%)	CT, n (%)	TT, n (%)	P
Idade						
≤ 50 anos	41	50,6	14 (43,7)	23 (60,5)	4 (36,4)	0,370
> 50 anos	40	49,4	18 (56,3)	15 (39,5)	7 (63,6)	
Tamanho do tumor						
≤ 5 cm	35	43,2	11 (34,4)	17 (44,7)	7 (63,6)	0,237
> 5 cm	46	56,8	21 (65,6)	21 (55,3)	4 (36,4)	
Estadio clínico						
II (A e B)	40	49,4	12 (37,5)	22 (55,0)	6 (54,5)	0,223
III (A e B)	41	50,6	20 (62,5)	16 (39,0)	5 (45,5)	
Histologia						
Ductal	67	82,7	28 (87,6)	31 (81,6)	8 (72,7)	0,067
Lobular	4	5,0	2 (6,2)	0 (----)	2 (18,2)	
Outros	10	12,3	2 (6,2)	7 (18,4)	1 (9,1)	
Grau histopatológico						
I	13	18,0	4 (14,3)	6 (17,6)	3 (30,0)	0,446
II	40	55,6	18 (64,3)	19 (55,9)	3 (30,0)	
III	19	26,4	6 (21,4)	9 (26,5)	4 (40,0)	
Não determinado	9	-				
Condição menopáusica						
Pré-menopausa	45	55,5	18 (56,3)	21 (55,3)	6 (54,5)	1,000
Pós-menopausa	36	44,5	14 (43,7)	17 (44,7)	5 (45,5)	
Receptor de estrógeno						
Positivo	50	63,3	19 (59,4)	24 (66,7)	7 (63,6)	0,899
Negativo	29	36,7	13 (40,6)	12 (33,3)	4 (36,4)	
Não determinado	2	-				
Receptor de progesterona						
Positivo	38	48,1	13 (40,6)	19 (52,8)	6 (54,5)	0,584
Negativo	41	51,9	19 (59,4)	17 (47,2)	5 (45,5)	
Não determinado	2	-				
p53						
Positivo	29	51,8	12 (57,1)	14 (50,0)	3 (42,8)	0,807
Negativo	27	48,2	9 (42,9)	14 (50,0)	4 (57,2)	
Não determinado	25	-				
erbB2						
Positivo	17	27,4	5 (20,0)	10 (34,5)	2 (25,0)	0,533
Negativo	45	72,6	20 (80,0)	19 (65,5)	6 (75,0)	
Não determinado	19	-				

Em relação à expressão das proteínas p53 e erbB2 nas células neoplásicas, 51,8% e 27,4%, respectivamente, foram positivas na detecção por IHC. Observou-se que somente o genótipo polimórfico homozigoto Pro/Pro do gene *TP53* apresentou uma frequência aumentada (83,4%) para expressão negativa da proteína p53 mutante em comparação aos genótipos heterozigoto Arg/Pro e homozigoto selvagem Arg/Arg, mas esta diferença não foi significativa ($p= 0,221$). As frequências para os genótipos restantes nos dois genes, em relação à expressão de p53 e erbB2, apresentaram distribuições similares.

Nas tabelas 7 e 8 está claramente demonstrado que a distribuição do estadio clínico inicial, o tamanho do tumor, a condição menopáusicas, a condição dos receptores de estrógeno e progesterona, a expressão de p53 mutante e erbB2 não foram significativamente diferentes para as variantes polimórficas tanto do gene *TP53*, quanto do gene *MDR-1*.

4.5. Distribuições dos genótipos dos genes *TP53* e *MDR-1* de acordo com a resposta clínica e patológica após a quimioterapia neoadjuvante.

A avaliação da resposta clínica foi baseada no critério RECIST. Para a análise estatística as respostas foram agrupadas em duas categorias: resposta objetiva (RO) e a não resposta (NR).

Como pode ser observado na Tabela 9, 77,8% das pacientes apresentaram resposta completa ou parcial. Para análise estatística os genótipos homozigoto selvagem e heterozigoto dos genes *TP53* e *MDR-1* foram agrupados e comparados com o genótipo homozigoto polimórfico (Arg/Arg + Arg/Pro vs. Pro/Pro; CC

+CT vs. TT, respectivamente). Quando analisado o polimorfismo do gene *TP53*, os genótipos Arg/Arg e Arg/Pro apresentaram freqüências aumentadas para o grupo RO (82,8% e 78,4%, respectivamente); e para o genótipo Pro/Pro observou-se uma freqüência aumentada desta variante no grupo NR (44,5%) em relação aos genótipos portadores do alelo Arg, entretanto, a análise estatística não revelou diferença significativa ($p= 0,1051$). No caso do gene *MDR-1*, o genótipo heterozigoto (CT) apresentou uma freqüência elevada no grupo RO (84,2%) e o genótipo polimórfico (TT) no grupo NR (36,4%), no entanto quando agrupados, não houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,2509$).

Tabela 9. Relação entre os polimorfismos dos genes *TP53* (Arg72Pro) e *MDR-1* (C3435T) e a resposta clínica após a quimioterapia neoadjuvante.

	Resposta Clínica ^a		
	NÚMERO (%)		P*
	RO ^b	NR ^c	
<i>TP53</i> (Arg/Arg)	29 (82,8)	6 (17,2)	0,1051
<i>TP53</i> (Arg/Pro)	29 (78,4)	8 (21,6)	
<i>TP53</i> (Pro/Pro)	5 (55,5)	4 (44,5)	
<i>MDR-1</i> (CC)	24 (75,0)	8 (25,0)	0,2509
<i>MDR-1</i> (CT)	32 (84,2)	6 (15,8)	
<i>MDR-1</i> (TT)	7 (63,6)	4 (36,4)	

^a Baseado no critério RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumor).

^b Resposta objetiva. ^c Não resposta.

* Genótipos homozigota selvagem + heterozigota vs. Genótipo homozigota polimórfico. (Arg/Arg + Arg/Pro vs. Pro/Pro; CC +CT vs. TT)

A resposta patológica foi baseada nos resultados do exame anátomo-patológico do tumor ou área tumoral remanescente como também dos gânglios axilares retirados. As classes RPC e DRM foram agrupadas em uma única categoria para a análise estatística, já que são consideradas como bons respondedores (Tabela 10).

Quando a resposta foi analisada, observou-se que 17,3% das pacientes apresentaram RPC ou DRM e 62,7% resultaram em DRE.

Tabela 10. Relação entre os polimorfismos dos genes *TP53* (Arg72Pro) e *MDR-1* (C3435T) e a resposta patológica após a quimioterapia neoadjuvante.

	Resposta Patológica		
	NÚMERO (%)		
	DRE ^a	DRM ^b + RPC ^c	P*
<i>TP53</i> (Arg/Arg)	29 (82,8)	5 ^b + 1 ^c (17,2)	1,0000
<i>TP53</i> (Arg/Pro)	30 (81,0)	3 ^b + 4 ^c (19,0)	
<i>TP53</i> (Pro/Pro)	8 (88,9)	0 ^b + 1 ^c (11,1)	
<i>MDR-1</i> (CC)	36 (85,7)	3 ^b + 3 ^c (14,3)	0,2034
<i>MDR-1</i> (CT)	30 (78,9)	5 ^b + 3 ^c (21,1)	
<i>MDR-1</i> (TT)	11 (100)	0 ^b + 0 ^c (0,0)	

^a Doença Residual Extensa. ^b Doença Residual Mínima. ^c Resposta Patológica Completa.

* (DRM + RPC) do genótipo homocigoto polimórfico comparado com os genótipos homocigoto selvagem e heterocigoto (ArgArg + ArgPro vs. ProPro; CC + CT vs. TT)

A distribuição das frequências genotípicas para o gene *TP53* foi homogênea em ambos os grupos de resposta. No caso do gene *MDR-1*, não foram observados indivíduos homocigotos TT. Não foi observada diferença estatisticamente

significativa quando comparados o grupo DRM +RPC em relação ao grupo DRE (p= 0,2034).

O número de linfonodos positivos para metástase pode estar ligado aos estadios mais avançados do tumor e, por este motivo, foi avaliado como outro parâmetro da resposta à quimioterapia. Nas tabelas 11 e 12, observam-se as frequências de linfonodos metastáticos para cada um dos genótipos nos genes *TP53* e *MDR-1*, respectivamente. Do total, 45,7% das pacientes foram negativos para linfonodos metastáticos, enquanto 33,7% apresentaram de 1 a 3 linfonodos e 21,3% apresentaram 4 ou mais linfonodos axilares metastáticos.

Para a análise estatística, os genótipos homozigoto selvagem e heterozigoto de cada gene foram agrupados e comparados com o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico.

Tabela 11. Relação entre o polimorfismo Arg72Pro do gene *TP53* e o número de linfonodos axilares metastáticos após a quimioterapia neoadjuvante.

Linfonodos metastáticos	NÚMERO (%)			P*
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
0	17 (48,6)	18 (48,6)	2 (22,2)	0,1700
1-3	11 (31,4)	10 (27,0)	6 (66,6)	0,0539
≥ 4	7 (20,0)	9 (24,4)	1 (11,2)	0,6762

* Para cada categoria o genótipo ProPro foi comparado com os genótipos ArgArg + ArgPro.

** estatisticamente significativo (p<0,05).

No caso do gene *TP53*, observou-se uma frequência aumentada no genótipo polimórfico para a classe 1-3 linfonodos quando comparada com os genótipos Arg/Arg e Arg/Pro, encontrando-se essa diferença próxima do valor considerado

estatisticamente significativo ($p= 0,0539$). Os genótipos homozigotos selvagem e heterozigoto apresentaram freqüências aumentadas para a classe livre de linfonodos metastáticos, mas estes valores não foram significativos ($p= 0,1700$).

Com relação ao polimorfismo do gene MDR-1, verificou-se uma freqüência aumentada do genótipo polimórfico TT na categoria ≥ 4 linfonodos (45,4%) quando comparada com os genótipos CC (14,7%) e CT (15,8%), mostrando uma diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0472$) (Tabela 12).

Tabela 12. Relação entre o polimorfismo C3435T do gene *MDR-1* e o número de linfonodos axilares metastáticos após a quimioterapia neoadjuvante.

Linfonodos metastáticos	NÚMERO (%)			P*
	CC	CT	TT	
0	15 (46,9)	19 (50,0)	3 (27,3)	0,2139
1-3	11 (34,4)	13 (34,2)	3 (27,3)	0,7436
≥ 4	6 (18,7)	6 (15,8)	5 (45,4)	0,0472**

*Para cada categoria o genótipo TT foi comparado com os genótipos CC +CT.

** estatisticamente significativo ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* e a susceptibilidade genética

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e, no Brasil, é a principal causa de morte que as acomete (INCA, 2008). Muitos avanços têm sido feitos para a detecção da doença em estádios iniciais e no tratamento do câncer e embora, vários fatores de risco tenham sido identificados, como os inerentes à predisposição genética, pouco é conhecido acerca da etiologia, biologia ou mecanismos moleculares subjacentes a carcinogênese.

Mutações no gene *TP53* são as alterações mais comuns em câncer e podem ser encontradas em 20-30% dos casos de câncer de mama esporádicos (Hainaut e Hollstein, 2000; Borresen-Dale, 2003). Em adição às mutações genéticas, alguns polimorfismos no gene *TP53* têm sido descritos. No códon 72 existe um sítio polimórfico, onde uma arginina ou prolina podem ser codificados, conferindo propriedades diferenciais às células que possuem um ou outro aminoácido (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Pim e Banks, 2004; Sullivan *et al.*, 2004).

Outra alteração no gene *TP53* foi descrita no códon 47, sugerindo que este polimorfismo é funcionalmente significativo e poderia ter influência sobre o risco de câncer, progressão e eficiência da quimioterapia (Li *et al.*, 2005), embora existam poucos relatos devido a baixa frequência deste polimorfismo (Felley-Bosco *et al.*, 1993).

Por outro lado, vários polimorfismos no gene *MDR-1*, têm sido reportados. No entanto, o polimorfismo silencioso C3435T, foi o único que demonstrou variações na expressão e na atividade da glicoproteína P, codificada por este gene (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Alguns relatos sugerem que as diferenças determinadas geneticamente no gene *MDR-1*, poderiam ter relevância sobre diversas doenças, incluindo o câncer, entretanto estes resultados são incertos e ainda precisam de confirmação (Fromm, 2002; Leonard *et al.*, 2003; Jamroziak *et al.*, 2004; Sakaeda, 2005; Cascorbi, 2006; Chinn e Kroetz, 2007).

Com base nestes dados, decidiu-se verificar se os polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* poderiam estar envolvidos no risco de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres brasileiras. Para isso, foi determinada a frequência do polimorfismo destes genes em 116 mulheres com câncer de mama e em 120 mulheres controles.

Dados na literatura, referentes à distribuição das frequências genotípicas do gene *TP53* e o risco de câncer de mama, são contraditórios (Papadakis *et al.*, 2000; Buyru *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Noma *et al.*, 2004; Damin *et al.*, 2006). É possível que estes resultados conflitantes sejam atribuídos às características inerentes à população analisada (Sjalander *et al.*, 1996a; Gaspar *et al.*, 2001; Tommiska *et al.*, 2005; Damin *et al.*, 2006), devido à substancial variação étnica e geográfica deste polimorfismo. Em concordância com esta hipótese, tem sido demonstrado que a distribuição do alelo Pro72 varia nos diferentes grupos étnicos (Sjalander *et al.*, 1996b) e a frequência do alelo Arg72 aumenta com a distância a partir do Equador (Beckman *et al.*, 1994). Suspitsin e colaboradores (2003),

sugerem que essas discrepâncias entre os trabalhos, além das diferenças étnicas e desvios aleatórios, poderia ser devido a publicações propensas a achados “positivos”.

Na amostra analisada, não foram observadas diferenças nas frequências genotípicas entre pacientes e controles, o que está de acordo com outros estudos, onde também não houve associação entre o risco de câncer de mama e o polimorfismo Arg72Pro (Suspitsin *et al.*, 2003; Tommiska *et al.*, 2005; Khadang *et al.*, 2007).

Em relação aos parâmetros idade e fatores de risco (idade ao primeiro parto, menopausa e antecedentes de câncer na família) não foram encontradas diferenças significativas nos subgrupos quando comparados com os polimorfismos de Arg72Pro. Quando avaliada a etnia, o grupo controle homozigoto Pro/Pro apresentou uma associação significativa com a categoria não brancos ($p= 0,0246$). Este resultado está de acordo com as variações étnicas acima mencionadas, apresentando maiores frequências do alelo Pro72 em populações negras (africanas), próximas ao Equador (Beckman *et al.*, 1994) e portanto, mulheres não brancas com o alelo TT teriam um risco menor de desenvolver câncer de mama. Em relação ao fator de risco menopausa, não foram encontradas diferenças, embora alguns autores, como Noma e colaboradores (2004), tenham observado que pacientes com câncer de mama positivos para receptores de estrógeno e na pós-menopausa têm um risco 3 vezes maior de desenvolver câncer de mama ($p= 0,01$).

Em relação ao polimorfismo Pro47Ser no gene *TP53*, não foram encontrados indivíduos com o alelo Ser47, portanto a amostra foi composta exclusivamente de indivíduos com genótipo homozigoto para o alelo selvagem Pro/Pro. Dados na literatura, diferem quanto à frequência deste polimorfismo, que aparentemente, também seria influenciado pela origem étnica da amostra, sugerindo inclusive que o alelo Ser47 estaria atuando em *cis* com o alelo Pro72 (Felley-Bosco *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005). Nossos resultados diferem das frequências encontradas por Leite e colaboradores (2006), em um estudo realizado em 229 indivíduos brasileiros, no qual a frequência do genótipo heterozigotos Pro47Ser foi 27%. A mistura étnica da população brasileira ocasionada por contínuos fluxos migratórios, poderia ser a responsável pelas diferentes frequências observadas. Estudos mais amplos, incluindo um maior número de indivíduos das diferentes regiões do Brasil, seriam necessários para estabelecer a real prevalência do alelo Ser47.

Em relação às frequências genóticas do polimorfismo C3435T do gene *MDR-1*, a maioria dos relatos encontrados na literatura diferem nos níveis de expressão encontrados, tanto no mRNA quanto na proteína, em função do alelo presente. Esse fato poderia modular a biodisponibilidade dos diferentes substratos da glicoproteína P no organismo, e conseqüentemente, o risco que essas diferenças poderiam representar frente às diversas doenças, entre elas, o câncer (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Cascorbi *et al.*, 2001; Sakaeda *et al.*, 2001; Fromm, 2002; Leonard *et al.*, 2003; Sakaeda, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* verificaram que em linhagens celulares de tecido mamário e de ovário a não expressão, ou a expressão basal do gene *MDR-1* esteve

significativamente associada a genótipos TT (Sauer *et al.*, 2002). Trabalhos mais recentes demonstram que indivíduos com pelo menos um alelo T, seriam mais suscetíveis ao desenvolvimento de câncer de mama (29,8% e 18% de genótipos homozigotos portadores do alelo T em pacientes e controles, respectivamente; $p = 0,013$) (Turgut *et al.*, 2007) e de endométrio (genótipo TT: 31,3%, pacientes; 22,2% , controles; e 23,6% em amostra de voluntários) ($p = 0.004$) (Mrozikiewicz *et al.*, 2007). Em contraste com esses resultados, Zubor e colaboradores (2007), encontraram que o alelo C esteve associado ao risco elevado de câncer de mama em mulheres com alto índice de massa corporal quando expostas a substâncias tóxicas.

Nossos resultados revelam que não houve diferenças significativas que possam indicar a prevalência de um ou outro alelo, ou genótipo do gene *MDR-1*, com o risco de desenvolvimento de câncer de mama na amostra analisada. No entanto, quando a amostra foi dividida por idade, observou-se uma associação significativa para os controles homozigotos TT acima de 50 anos em relação ao seu respectivo controle. Estes dados discordam dos resultados de Kurzawski e colaboradores (2005) que observaram que pacientes com o genótipo TT ou que possuem pelo menos um alelo T e idade abaixo de 50 anos, apresentaram um risco aumentado em 2,7 vezes e 1,7 vezes, respectivamente, de desenvolver de câncer de cólon ($p < 0,05$).

Quanto aos outros subgrupos analisados, não foi observada diferença estatisticamente significativa na amostra estudada.

5.2. Polimorfismos nos genes *TP53* e *MDR-1* e a resposta à quimioterapia neoadjuvante.

As proteínas p53 e mdrl estão envolvidas em diferentes processos celulares, dentre eles a apoptose e o efluxo de drogas, respectivamente, sendo estes dois processos muito importantes na resposta dos pacientes às diferentes drogas que comumente são utilizadas no tratamento contra o câncer. A quimioterapia neoadjuvante oferece a oportunidade de verificar mudanças em variáveis biológicas, antes e depois do tratamento, utilizando o tumor como medida de quimio-susceptibilidade. A identificação de novos fatores preditivos para a resposta ao tratamento pré-operatório poderia, portanto, ajudar a definir subgrupos de pacientes que seriam, provavelmente, beneficiados a partir deste tipo de abordagem terapêutica (Bonadonna *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1998).

O alcance da resposta patológica na quimioterapia neoadjuvante é uma medida direta da sensibilidade à droga e está correlacionada com a sobrevida (Fisher *et al.*, 1998). Na avaliação da resposta clínica, as informações sobre a resposta histológica de tumores de mama primários e metástases axilares à quimioterapia neoadjuvante são limitadas. Aqueles pacientes que apresentam resposta patológica completa, após a quimioterapia neoadjuvante, deveriam ter uma maior chance de sobrevida livre de doença quando comparados com pacientes com respostas inferiores (Ellis *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 1998; Kuerer *et al.*, 1999).

Diversos estudos demonstram que a apoptose é induzida pela quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama (Ellis *et al.*, 1997; Cascorbi *et al.*,

2001; Tiezzi *et al.*, 2006). A proteína p53 é responsável pela morte daquelas células que são danificadas pela ação dos agentes anticancerígenos. Variações em p53, como o polimorfismo Arg72Pro, que alteram a capacidade apoptótica de uma célula, poderiam levar às alterações da resposta do tumor à quimioterapia (Sullivan *et al.*, 2004).

Um dos maiores problemas da quimioterapia no câncer é o desenvolvimento de resistência cruzada aos agentes citotóxicos estabelecidos, incluindo substâncias as quais as células do tumor nunca antes foram expostas. Este fenômeno, conhecido como resistência a múltiplas drogas está, em muitos dos casos, associada com a hiper expressão do gene *MDR-1*. Portanto, alterações nos níveis de expressão do produto gênico conferidas pelos polimorfismos, como é o caso de C3435T, poderiam ser utilizados como marcadores genéticos para a estimativa da resposta à quimioterapia (Leonard *et al.*, 2003).

Características clínico-patológicas dos pacientes como idade, tamanho do tumor, histologia, grau histológico, receptores hormonais, entre outras são fatores considerados para a escolha do melhor tratamento a ser utilizado em cada paciente. Foi por este motivo que a distribuição destas características foi examinada previamente à avaliação da resposta, com o intuito de determinar se existia associação com alguns dos polimorfismos.

Trabalhos na literatura indicam a relação de algumas características clínico-patológicas com o gene *TP53*, como por exemplo, o alelo Pro72 ter sido mais freqüente em carcinomas do tipo lobular e em tumores grau I, e o alelo Arg72 mais freqüente em carcinomas do tipo lobular e em tumores grau III ($p= 0,004$ e $p=$

0,029, para histologia e grau, respectivamente). No entanto, para outras características não foram observadas diferenças significativas (Tommiska *et al.*, 2005). A associação entre uma maior frequência de tumores positivos para receptor de estrógeno no genótipo Arg/Arg, também tem sido descrita (Noma *et al.*, 2004). Entretanto, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, não há associação significativa entre as características clínico-patológicas e o polimorfismo Arg72Pro (Papadakis *et al.*, 2000; Bonafe *et al.*, 2003; Tommiska *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Damin *et al.*, 2006; Wegman *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2007) ou o polimorfismo C3435T (Kafka *et al.*, 2003; Turgut *et al.*, 2007).

No presente trabalho não foi observada associações entre as características clínico-patológicas e a distribuição dos genótipos, tanto para os polimorfismos do gene *TP53* quanto para o gene *MDR-1*. Estes resultados indicam que cada um dos genótipos apresentava características clínico-patológicas similares antes da quimioterapia neoadjuvante ser administrada; portanto, as diferentes respostas ao tratamento não seriam devido aos potenciais efeitos destas características.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, em relação aos polimorfismos nos genes *TP53* e *MDR-1*, mostram resultados de resposta à terapia associada à sobrevida livre de doença ou sobrevida total, ou seja, ao tratamento depois de longos períodos de tempo, comumente, 5 anos após o início da quimioterapia (Bonadonna, 1992; Ellis *et al.*, 1998; Aas *et al.*, 2003; Bonafe *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2004; Tommiska *et al.*, 2005; Wegman *et al.*, 2006; Mazouni *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2007; Turgut *et al.*, 2007). São poucos os ensaios clínicos e outros estudos que têm utilizado a resposta patológica do tumor e dos linfonodos

axilares como parâmetro da resposta ao tratamento neoadjuvante (Kafka *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Steger *et al.*, 2007) .

Estudos avaliando a resposta ao tratamento em relação ao polimorfismo Arg72Pro apresentam diversos resultados. Bonafé e colaboradores (2003) encontraram que a retenção do alelo Arg72 no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama heterozigotos Arg/Pro, está associado com redução na sobrevida livre de doença e sobrevida total. Outros autores observaram uma sobrevida reduzida no caso de pacientes homozigotos Pro/Pro no tratamento com diferentes regimes (Tommiska *et al.*, 2005); no tratamento adjuvante com CMF (ciclofosfamida + metotrexato + 5'flouroracil), mas não quando receberam terapia hormonal adjuvante (Toyama *et al.*, 2007). Por outro lado, Wegman e colaboradores (2006) encontraram um aumento na sobrevida livre de recorrência local do tumor, embora estatisticamente não significativa ($p=0,21$), em pacientes com o alelo Pro72 quando compararam a radioterapia ou quimioterapia (CMF); entretanto, essa diferença foi significativa quando comparados pacientes com e sem o tratamento com tamoxifeno ($p= 0,0033$).

O número de trabalhos encontrados para o polimorfismo C3435T do gene *MDR-1* é reduzido. Wu e colaboradores (2006) observaram, em pacientes com câncer de esôfago, que o alelo T aumentou a sobrevida daqueles indivíduos com genótipos homozigoto polimórfico e heterozigoto (médias 42,3 meses e 29,3 meses, respectivamente) quando comparados com pacientes com genótipos homozigoto selvagem (CC) (média= 16,8 meses) ($p= 0,0296$). Em contraste, Sohn e colaboradores (2006) observaram que o genótipo CC estava associado com uma

melhor resposta à quimioterapia, comparando respondedores e não respondedores e agrupando os genótipos CT e TT ($p= 0,025$). Isto seria devido ao baixo nível de expressão da glicoproteína P para o genótipo homozigoto selvagem em pacientes com câncer de células pequenas de pulmão, no tratamento combinado de etoposido e cisplatina. Por outro lado, Turgut e colaboradores (2007) não encontraram associação estatisticamente significativa entre a sobrevida livre de doença e o polimorfismo C3435T em pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia e radioterapia.

Na análise da resposta clínica, nossos dados revelaram uma frequência aumentada dos pacientes com genótipos homozigotos polimórficos, para ambos os genes, no grupo de não resposta quando comparados aos genótipos selvagens; entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. A análise da resposta patológica também não demonstrou associações significativas.

Nossos resultados diferem de outros encontrados na literatura os quais observaram que o genótipo Pro/Pro foi 7 vezes menos sensível ao tratamento neoadjuvante baseado em antraciclinas, quando comparado com pacientes com as variantes Arg/Pro e Arg/Arg (OR= 6,7; 95% IC= 1,4 - 31,2; $p= 0,016$) (Xu *et al.*, 2005). Por outro lado, Kafka e colaboradores (2003), no polimorfismo C3435T do gene *MDR-1*, encontraram que pacientes portadores do genótipo polimórfico TT tiveram uma associação significativa entre a resposta clínica completa em relação aos genótipos CC e CT, quando comparada com a não resposta clínica ($p= 0,029$); entretanto, essa associação não foi significativa quando comparada com a resposta patológica completa.

Quanto à relação entre as variantes polimórficas e a resposta patológica nos linfonodos axilares após a quimioterapia, nossos dados demonstraram uma frequência aumentada do genótipo Pro/Pro no grupo positivo para 1-3 linfonodos axilares quando comparada com os genótipos homozigoto selvagem e heterozigoto, embora estatisticamente esta diferença tenha ficado acima do nível de significância ($p= 0,0539$). Estes resultados estão em oposição com os observados por Xu e colaboradores (2005), onde os genótipos com o alelo Arg72 tiveram uma frequência aumentada no grupo negativo para linfonodos axilares metastáticos, enquanto o genótipo homozigoto Pro/Pro foi mais freqüente no grupo ≥ 4 linfonodos axilares metastáticos. No caso do polimorfismo C3435T para o *MDR-1*, o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico TT teve uma frequência aumentada no grupo ≥ 4 linfonodos axilares metastáticos em comparação aos genótipos com o alelo C, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que o genótipo TT foi 4 vezes menos sensível ao tratamento de quimioterapia neoadjuvante; entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura para comparar este resultado.

A baixa frequência de pacientes com resposta clínica e patológica completa observada neste trabalho pode estar associada ao tamanho do tumor e aos ciclos de quimioterapia administrados. Embora, outros autores demonstrem diferenças significativas envolvendo a resposta ao tratamento, as amostras por eles analisadas apresentavam variações de grande relevância com relação ao tamanho do tumor (na sua maioria inferiores a 3 cm) e ao protocolo de tratamento utilizado

(superior a 4 ciclos de quimioterapia), quando comparadas às amostras analisadas no presente trabalho.

Esta discrepância pode explicar a baixa frequência de pacientes que apresentaram resposta clínica e patológica completa neste estudo em relação às frequências relatadas na literatura (Kafka *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005).

Além dos dados acima discutidos, outros fatores podem estar associados às variações envolvidas na resposta ao tratamento, dentre elas os protocolos de quimioterapia administrados. É sabido ainda que, um número maior de pacientes deve ser analisado para se determinar com maior precisão a influência dos polimorfismos Arg72Pro e C3435T na resposta à quimioterapia neoadjuvante e assim, definir o possível papel dos mesmos como marcadores preditivos de resposta.

Embora este trabalho tenha demonstrado diversos dados relevantes, ainda restam questões a serem esclarecidas com o objetivo de determinar o tratamento mais adequado para cada paciente e para cada tipo de câncer, visando assim um maior sucesso na terapia, e conseqüentemente, a melhora na sobrevida e na qualidade de vida das pacientes.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a investigação dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDR-1* associados à susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama. Também foi avaliado o envolvimento desses polimorfismos na resposta ao tratamento quimioterápico. Diante dos objetivos propostos e os resultados obtidos foram inferidas as seguintes conclusões:

1. Não foi verificada nenhuma associação entre o polimorfismo do *TP53* e o risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama.
2. O polimorfismo do gene *MDR-1*, não apresentou relação com susceptibilidade aumentada para o câncer de mama.
3. A frequência do genótipo homozigoto polimórfico TT para o gene *MDR-1* foi prevalente no grupo controle com idade superior a 50 anos.
4. A frequência aumentada do homozigoto polimórfico Pro/Pro do gene *TP53* esteve associada ao grupo de controles não brancos, sugerindo associação deste polimorfismo com a etnia.
5. Foi observada, entre as pacientes com câncer de mama, uma tendência de associação entre o genótipo homozigoto TT e o carcinoma do tipo lobular.
6. Não foi observada nenhuma associação entre os genótipos dos genes *TP53* e *MDR-1* com relação à resposta clínica e patológica após a quimioterapia neoadjuvante.

7. Foi observado um aumento da frequência do genótipo Pro/Pro do gene *TP53* em relação à presença de 1-3 linfonodos axilares metastáticos.
8. O genótipo TT do gene *MDR-1* apresentou-se associado à presença de 4 ou mais linfonodos axilares metastáticos.
9. Os polimorfismos analisados não apresentaram associação relevante em relação às demais variáveis clínicas avaliadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, T, GEISLER, S, EIDE, GE, HAUGEN, DF, VARHAUG, JE, BASSOE, AM, THORSEN, T, BERNTSEN, H, BORRESEN-DALE, AL, AKSLEN, LA and LONNING, PE "Predictive value of tumour cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy." **Eur J Cancer** 39(4): 438-446 (2003).
- AGRESTI, A. A survey of exact inference for contingency tables. **Stat. Sci.**, v.7, p.131-153 (1992)
- AHEARNE PM, LEACH SC, FEIG BW. Invasive breast cancer. In: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM, editors. **The MD Anderson Surgical Oncology Handbook**, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 13-37 (1999).
- AMEYAW, MM, REGATEIRO, F, LI, T, LIU, X, TARIQ, M, MOBAREK, A, THORNTON, N, FOLAYAN, GO, GITHANG'A, J, INDALO, A, OFORI-ADJEI, D, PRICE-EVANS, DA and MCLEOD, HL "MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity." **Pharmacogenetics** 11(3): 217-221 (2001).
- AVENDANO, C and MENENDEZ, JC "Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR)." **Curr Med Chem** 9(2): 159-193 (2002).
- BECKMAN, G, BIRGANDER, R, SJALANDER, A, SAHA, N, HOLMBERG, PA, KIVELA, A and BECKMAN, L "Is p53 polymorphism maintained by natural selection?" **Hum Hered** 44(5): 266-270 (1994).
- BERGAMASCHI, D, SAMUELS, Y, SULLIVAN, A, ZVELEBIL, M, BREYSSENS, H, BISSO, A, DEL SAL, G, SYED, N, SMITH, P, GASCO, M, CROOK, T and LU, X "iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53." **Nat Genet** 38(10): 1133-1141 (2006).
- BERNAL, ML, SINUES, B, FANLO, A and MAYAYO, E "Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population." **Ther Drug Monit** 25(1): 107-111 (2003).
- BLOOM, HJ and RICHARDSON, WW "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." **Br J Cancer** 11(3): 359-377 (1957).
- BONADONNA, G "Evolving concepts in the systemic adjuvant treatment of breast cancer." **Cancer Res** 52(8): 2127-2137 (1992).
- BONADONNA, G, VALAGUSSA, P, BRAMBILLA, C, MOLITERNI, A, ZAMBETTI, M and FERRARI, L "Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer with chemotherapy and/or endocrine therapy." **Semin Oncol** 18(6): 515-524 (1991).

- BONAFE, M, CECCARELLI, C, FARABEGOLI, F, SANTINI, D, TAFFURELLI, M, BARBI, C, MARZI, E, TRAPASSI, C, STORCI, G, OLIVIERI, F and FRANCESCHI, C "Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients." **Clin Cancer Res** 9(13): 4860-4864 (2003).
- BORRESEN-DALE, AL "TP53 and breast cancer." **Hum Mutat** 21(3): 292-300 (2003).
- BUYRU, N, TIGLI, H and DALAY, N "P53 codon 72 polymorphism in breast cancer." **Oncol Rep** 10(3): 711-714 (2003).
- CASCORBI, I "Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs." **Pharmacol Ther** 112(2): 457-473 (2006).
- CASCORBI, I, GERLOFF, T, JOHNE, A, MEISEL, C, HOFFMEYER, S, SCHWAB, M, SCHAEFFELER, E, EICHELBAUM, M, BRINKMANN, U and ROOTS, I "Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects." **Clin Pharmacol Ther** 69(3): 169-174 (2001).
- CHEN, CJ, CHIN, JE, UEDA, K, CLARK, DP, PASTAN, I, GOTTESMAN, MM and RONINSON, IB "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells." **Cell** 47(3): 381-389 (1986).
- CHINN, LW and KROETZ, DL "ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise." **Clin Pharmacol Ther** 81(2): 265-269 (2007).
- CUMMINGS, S and OLOPADE, O "Predisposition testing for inherited breast cancer." **Oncology (Williston Park)** 12(8): 1227-1241; discussion 1241-1222 (1998).
- DAMIN, AP, FRAZZON, AP, DAMIN, DC, ROEHE, A, HERMES, V, ZETTLER, C and ALEXANDRE, CO "Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk." **Cancer Detect Prev** 30(6): 523-529 (2006).
- DUMONT, P, LEU, JI, DELLA PIETRA, AC, 3RD, GEORGE, DL and MURPHY, M "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." **Nat Genet** 33(3): 357-365 (2003).
- DUNNING, AM, HEALEY, CS, PHAROAH, PD, TEARE, MD, PONDER, BA and EASTON, DF "A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk." **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 8(10): 843-854 (1999).
- ELLIS, P, SMITH, I, ASHLEY, S, WALSH, G, EBBS, S, BAUM, M, SACKS, N and MCKINNA, J "Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer." **J Clin Oncol** 16(1): 107-114 (1998).
- ELLIS, PA, SMITH, IE, MCCARTHY, K, DETRE, S, SALTER, J and DOWSETT, M "Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer." **Lancet** 349(9055): 849 (1997).

- ELSTON, CW and ELLIS, IO "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." **Histopathology** 19(5): 403-410 (1991).
- FELLEY-BOSCO, E, WESTON, A, CAWLEY, HM, BENNETT, WP and HARRIS, CC "Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene." **Am J Hum Genet** 53(3): 752-759 (1993).
- FEUER, EJ, WUN, LM, BORING, CC, FLANDERS, WD, TIMMEL, MJ and TONG, T "The lifetime risk of developing breast cancer." **J Natl Cancer Inst** 85(11): 892-897 (1993).
- FISHER, B, BRYANT, J, WOLMARK, N, MAMOUNAS, E, BROWN, A, FISHER, ER, WICKERHAM, DL, BEGOVIC, M, DECILLIS, A, ROBIDOUX, A, MARGOLESE, RG, CRUZ, AB, JR., HOEHN, JL, LEES, AW, DIMITROV, NV and BEAR, HD "Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer." **J Clin Oncol** 16(8): 2672-2685 (1998).
- FROMM, MF "Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk." **Toxicology** 181-182: 299-303 (2002).
- GARBER, JE, GOLDSTEIN, AM, KANTOR, AF, DREYFUS, MG, FRAUMENI, JF, JR. and LI, FP "Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome." **Cancer Res** 51(22): 6094-6097 (1991).
- GASPAR, PA, HUTZ, MH, SALZANO, FM and WEIMER, TA "TP53 polymorphisms and haplotypes in South Amerindians and neo-Brazilians." **Ann Hum Biol** 28(2): 184-194 (2001).
- GEWIRTZ, DA "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." **Biochem Pharmacol** 57(7): 727-741 (1999).
- GOODE, EL, DUNNING, AM, KUSCHEL, B, HEALEY, CS, DAY, NE, PONDER, BA, EASTON, DF and PHAROAH, PP "Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study." **Cancer Res** 62(11): 3052-3057 (2002).
- HAINAUT, P and HOLLSTEIN, M "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." **Adv Cancer Res** 77: 81-137 (2000).
- HARRIS, N, BRILL, E, SHOHAT, O, PROKOCIMER, M, WOLF, D, ARAI, N and ROTTER, V "Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein." **Mol Cell Biol** 6(12): 4650-4656 (1986).
- HENDERSON BE, BERNSTEIN L. Endogenous and exogenous hormonal factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S Jr, editors. **Diseases of the Breast**. Philadelphia: Lippincott-Ravan Publishers, 185-200 (1996).
- HOFFMEYER, S, BURK, O, VON RICHTER, O, ARNOLD, HP, BROCKMOLLER, J, JOHNE, A, CASCORBI, I, GERLOFF, T, ROOTS, I, EICHELBAUM, M and BRINKMANN, U "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-

- glycoprotein expression and activity in vivo." **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(7): 3473-3478 (2000).
- HOLLSTEIN, M, SIDRANSKY, D, VOGELSTEIN, B and HARRIS, CC "p53 mutations in human cancers." **Science** 253(5015): 49-53 (1991).
- HUANG, XE, HAMAJIMA, N, KATSUDA, N, MATSUO, K, HIROSE, K, MIZUTANI, M, IWATA, H, MIURA, S, XIANG, J, TOKUDOME, S and TAJIMA, K "Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer." **Breast Cancer** 10(4): 307-311 (2003).
- HULKA, BS and MOORMAN, PG "Breast cancer: hormones and other risk factors." **Maturitas** 38(1): 103-113; discussion 113-106 (2001).
- JAMROZIAK, K, MLYNARSKI, W, BALCERCZAK, E, MISTYGACZ, M, TRELINSKA, J, MIROWSKI, M, BODALSKI, J and ROBAK, T "Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia." **Eur J Haematol** 72(5): 314-321 (2004).
- JULIANO, RL and LING, V "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." **Biochim Biophys Acta** 455(1): 152-162 (1976).
- KAFKA, A, SAUER, G, JAEGER, C, GRUNDMANN, R, KREIENBERG, R, ZEILLINGER, R and DEISSLER, H "Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer." **Int J Oncol** 22(5): 1117-1121 (2003).
- KHADANG, B, FATTAHI, MJ, TALEI, A, DEHAGHANI, AS and GHADERI, A "Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women." **Cancer Genet Cytogenet** 173(1): 38-42 (2007).
- KLEINBAUM, DG, KUPPER, LL, MORGENSTERN, H. Epidemiologic research: Principles and quantitative methods. Belmont, CA: Wadsworth. (1982).
- KIM, RB, LEAKE, BF, CHOO, EF, DRESSER, GK, KUBBA, SV, SCHWARZ, UI, TAYLOR, A, XIE, HG, MCKINSEY, J, ZHOU, S, LAN, LB, SCHUETZ, JD, SCHUETZ, EG and WILKINSON, GR "Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans." **Clin Pharmacol Ther** 70(2): 189-199 (2001).
- KRISTENSEN, VN and BORRESEN-DALE, AL "Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism." **Mutat Res** 462(2-3): 323-333 (2000).
- KUERER, HM, NEWMAN, LA, SMITH, TL, AMES, FC, HUNT, KK, DHINGRA, K, THERIAULT, RL, SINGH, G, BINKLEY, SM, SNEIGE, N, BUCHHOLZ, TA, ROSS, MI, MCNEESE, MD, BUZDAR, AU, HORTOBAGYI, GN and SINGLETARY, SE "Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy." **J Clin Oncol** 17(2): 460-469 (1999).

- KURZAWSKI, M, DROZDZIK, M, SUCHY, J, KURZAWSKI, G, BIALECKA, M, GORNIK, W and LUBINSKI, J "Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in colon cancer patients." **Eur J Clin Pharmacol** 61(5-6): 389-394 (2005).
- LEE, SS, KIM, SY, KIM, WY, THI-LE, H, YOON, YR, YEA, SS and SHIN, JG "MDR1 genetic polymorphisms and comparison of MDR1 haplotype profiles in Korean and Vietnamese populations." **Ther Drug Monit** 27(4): 531-535 (2005).
- LEITE, JL, MANFRINATTO, JA, MAZZALI, M and WARD, LS "Polymorphisms at exon 4 of p53 and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients." **Transpl Int** 19(9): 732-737 (2006).
- LEONARD, GD, FOJO, T and BATES, SE "The role of ABC transporters in clinical practice." **Oncologist** 8(5): 411-424 (2003).
- LI, X, DUMONT, P, DELLA PIETRA, A, SHETLER, C and MURPHY, ME "The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant." **J Biol Chem** 280(25): 24245-24251 (2005).
- LINN, SC, PINEDO, HM, VAN ARK-OTTE, J, VAN DER VALK, P, HOEKMAN, K, HONKOOP, AH, VERMORKEN, JB and GIACCONE, G "Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy." **Int J Cancer** 71(5): 787-795 (1997).
- LIU, G, MILLER, DP, ZHOU, W, THURSTON, SW, FAN, R, XU, LL, LYNCH, TJ, WAIN, JC, SU, L and CHRISTIANI, DC "Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma." **Cancer Res** 61(24): 8718-8722 (2001).
- MATLASHEWSKI, GJ, TUCK, S, PIM, D, LAMB, P, SCHNEIDER, J and CRAWFORD, LV "Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53." **Mol Cell Biol** 7(2): 961-963 (1987).
- MAZOUNI, C, PEINTINGER, F, WAN-KAU, S, ANDRE, F, GONZALEZ-ANGULO, AM, SYMMANS, WF, MERIC-BERNSTAM, F, VALERO, V, HORTOBAGYI, GN and PUSZTAI, L "Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome." **J Clin Oncol** 25(19): 2650-2655 (2007).
- MEIJERS-HEIJBOER, H, VAN DEN OUWELAND, A, KLIJN, J, WASIELEWSKI, M, DE SNOO, A, OLDENBURG, R, HOLLESTELLE, A, HOUBEN, M, CREPIN, E, VAN VEGHEL-PLANDSOEN, M, ELSTRODT, F, VAN DUIJN, C, BARTELS, C, MEIJERS, C, SCHUTTE, M, MCGUFFOG, L, THOMPSON, D, EASTON, D, SODHA, N, SEAL, S, BARFOOT, R, MANGION, J, CHANG-CLAUDE, J, ECCLES, D, EELES, R, EVANS, DG, HOULSTON, R, MURDAY, V, NAROD, S, PERETZ, T, PETO, J, PHELAN, C, ZHANG, HX, SZABO, C, DEVILEE, P, GOLDGAR, D, FUTREAL, PA, NATHANSON, KL, WEBER, B, RAHMAN, N and STRATTON, MR "Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations." **Nat Genet** 31(1): 55-59 (2002).

- MINISTÉRIO DA SAÚDE: Incidência de câncer e mortalidade no Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2008.
- MORROW, CS and COWAN, K "Drug resistance and cancer." **Adv Exp Med Biol** 330: 287-305 (1993).
- MROZIKIEWICZ, PM, SEREMAK-MROZIKIEWICZ, A, SEMCZUK, A, LANDT, O, BREBOROWICZ, GH and DREWS, K "The significance of C3435T point mutation of the MDR1 gene in endometrial cancer." **Int J Gynecol Cancer** 17(3): 728-731 (2007).
- NGUYEN, KT, LIU, B, UEDA, K, GOTTESMAN, MM, PASTAN, I and CHIN, KV "Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants." **Oncol Res** 6(2): 71-77 (1994).
- NOMA, C, MIYOSHI, Y, TAGUCHI, T, TAMAKI, Y and NOGUCHI, S "Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women." **Cancer Lett** 210(2): 197-203 (2004).
- PAPADAKIS, EN, DOKIANAKIS, DN and SPANDIDOS, DA "p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer." **Mol Cell Biol Res Commun** 3(6): 389-392 (2000).
- PIM, D and BANKS, L "p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression." **Int J Cancer** 108(2): 196-199 (2004).
- RONINSON, IB, CHIN, JE, CHOI, KG, GROS, P, HOUSMAN, DE, FOJO, A, SHEN, DW, GOTTESMAN, MM and PASTAN, I "Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells." **Proc Natl Acad Sci U S A** 83(12): 4538-4542 (1986).
- SAKAEDA, T "MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction?" **Drug Metab Pharmacokinet** 20(6): 391-414 (2005).
- SAKAEDA, T, NAKAMURA, T, HORINOUCHE, M, KAKUMOTO, M, OHMOTO, N, SAKAI, T, MORITA, Y, TAMURA, T, AOYAMA, N, HIRAI, M, KASUGA, M and OKUMURA, K "MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects." **Pharm Res** 18(10): 1400-1404 (2001).
- SAKAMURO, D, SABBATINI, P, WHITE, E and PRENDERGAST, GC "The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest." **Oncogene** 15(8): 887-898 (1997).
- SAUER, G, KAFKA, A, GRUNDMANN, R, KREIENBERG, R, ZEILLINGER, R and DEISSLER, H "Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines." **Cancer Lett** 185(1): 79-85 (2002).
- SAUNA, ZE, SMITH, MM, MULLER, M, KERR, KM and AMBUDKAR, SV "The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein." **J Bioenerg Biomembr** 33(6): 481-491 (2001).

- SCHAEFFELER, E, EICHELBAUM, M, BRINKMANN, U, PENGER, A, ASANTE-POKU, S, ZANGER, UM and SCHWAB, M "Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people." **Lancet** 358(9279): 383-384 (2001).
- SINGLETARY, SE, ALLRED, C, ASHLEY, P, BASSETT, LW, BERRY, D, BLAND, KI, BORGES, PI, CLARK, G, EDGE, SB, HAYES, DF, HUGHES, LL, HUTTER, RV, MORROW, M, PAGE, DL, RECHT, A, THERIAULT, RL, THOR, A, WEAVER, DL, WIEAND, HS and GREENE, FL "Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer." **J Clin Oncol** 20(17): 3628-3636 (2002).
- SJALANDER, A, BIRGANDER, R, HALLMANS, G, CAJANDER, S, LENNER, P, ATHLIN, L, BECKMAN, G and BECKMAN, L "p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer." **Carcinogenesis** 17(6): 1313-1316 (1996a).
- SJALANDER, A, BIRGANDER, R, SAHA, N, BECKMAN, L and BECKMAN, G "p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups." **Hum Hered** 46(1): 41-48 (1996b).
- SOHN, JW, LEE, SY, LEE, SJ, KIM, EJ, CHA, SI, KIM, CH, LEE, JT, JUNG, TH and PARK, JY "MDR1 polymorphisms predict the response to etoposide-cisplatin combination chemotherapy in small cell lung cancer." **Jpn J Clin Oncol** 36(3): 137-141 (2006).
- SOUSSI, T and BEROUD, C "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." **Nat Rev Cancer** 1(3): 233-240 (2001).
- STEGER, GG, GALID, A, GNANT, M, MLINERITSCH, B, LANG, A, TAUSCH, C, RUDAS, M, GREIL, R, WENZEL, C, SINGER, CF, HAID, A, POSTLBERGER, S, SAMONIGG, H, LUSCHIN-EBENGREUTH, G, KWASNY, W, KLUG, E, KUBISTA, E, MENZEL, C and JAKESZ, R "Pathologic complete response with six compared with three cycles of neoadjuvant epirubicin plus docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor in operable breast cancer: results of ABCSG-14." **J Clin Oncol** 25(15): 2012-2018 (2007).
- SULLIVAN, A, SYED, N, GASCO, M, BERGAMASCHI, D, TRIGIANTE, G, ATTARD, M, HILLER, L, FARRELL, PJ, SMITH, P, LU, X and CROOK, T "Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo." **Oncogene** 23(19): 3328-3337 (2004).
- SUSPITSIN, EN, BUSLOV, KG, GRIGORIEV, MY, ISHUTKINA, JG, ULIBINA, JM, GORODINSKAYA, VM, POZHARISSKI, KM, BERSTEIN, LM, HANSON, KP, TOGO, AV and IMYANITOV, EN "Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition." **Int J Cancer** 103(3): 431-433 (2003).
- THERASSE, P, ARBUCK, SG, EISENHAEUER, EA, WANDERS, J, KAPLAN, RS, RUBINSTEIN, L, VERWEIJ, J, VAN GLABBEKE, M, VAN OOSTEROM, AT, CHRISTIAN, MC and GWYTHYER, SG "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." **J Natl Cancer Inst** 92(3): 205-216 (2000).

- THOMAS, M, KALITA, A, LABRECQUE, S, PIM, D, BANKS, L and MATLASHEWSKI, G "Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically." **Mol Cell Biol** 19(2): 1092-1100 (1999).
- TIEZZI, DG, DE ANDRADE, JM, CANDIDO DOS REIS, FJ, MARANA, HR, RIBEIRO-SILVA, A, TIEZZI, MG and PEREIRA, AP "Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer." **Pathology** 38(1): 21-27 (2006).
- TNM - Classificação de Tumores Malignos. 6ª edição. União Internacional Contra o Câncer (UICC). Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2004.
- TOMMISKA, J, EEROLA, H, HEINONEN, M, SALONEN, L, KAARE, M, TALLILA, J, RISTIMAKI, A, VON SMITTEN, K, AITTO MAKI, K, HEIKKILA, P, BLOMQVIST, C and NEVANLINNA, H "Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival." **Clin Cancer Res** 11(14): 5098-5103 (2005).
- TOYAMA, T, ZHANG, Z, NISHIO, M, HAMAGUCHI, M, KONDO, N, IWASE, H, IWATA, H, TAKAHASHI, S, YAMASHITA, H and FUJII, Y "Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients." **Breast Cancer Res** 9(3): R34 (2007).
- TSONGALIS, GJ, LINFERT, DR, JOHNSON, RC, ACKROYD, R, BERMAN, MM and RICCI, A, JR. "Double heterozygosity for mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in a breast cancer patient." **Arch Pathol Lab Med** 122(6): 548-550 (1998).
- TURGUT, S, YAREN, A, KURSUNLUOGLU, R and TURGUT, G "MDR1 C3435T polymorphism in patients with breast cancer." **Arch Med Res** 38(5): 539-544 (2007).
- WALKER, KK and LEVINE, AJ "Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression." **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(26): 15335-15340 (1996).
- WANG, LG, LIU, XM, KREIS, W and BUDMAN, DR "The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review." **Cancer Chemother Pharmacol** 44(5): 355-361 (1999).
- WANG, W, ZHANG, XD, GUAN, DL, LU, YP, MA, LL, HU, XP, ZHANG, P, WANG, Y and CHEN, X "Relationship between MDR1 polymorphism and blood concentration of cyclosporine A." **Chin Med J (Engl)** 118(24): 2097-2100 (2005).
- WEGMAN, P, STAL, O, ASKMALM, MS, NORDENSKJOLD, B, RUTQVIST, LE and WINGREN, S "p53 polymorphic variants at codon 72 and the outcome of therapy in randomized breast cancer patients." **Pharmacogenet Genomics** 16(5): 347-351 (2006).
- WOODWARD, WA, STROM, EA, TUCKER, SL, MCNEESE, MD, PERKINS, GH, SCHECHTER, NR, SINGLETARY, SE, THERIAULT, RL, HORTOBAGYI, GN, HUNT, KK and BUCHHOLZ, TA "Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival." **J Clin Oncol** 21(17): 3244-3248 (2003).

- WOOSTER, R and WEBER, BL "Breast and ovarian cancer." **N Engl J Med** 348(23): 2339-2347 (2003).
- WU, X, GU, J, WU, TT, SWISHER, SG, LIAO, Z, CORREA, AM, LIU, J, ETZEL, CJ, AMOS, CI, HUANG, M, CHIANG, SS, MILAS, L, HITTELMAN, WN and AJANI, JA "Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer." **J Clin Oncol** 24(23): 3789-3798 (2006).
- XU, Y, YAO, L, OUYANG, T, LI, J, WANG, T, FAN, Z, LIN, B, LU, Y and XIE, Y "p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer." **Clin Cancer Res** 11(20): 7328-7333 (2005).
- ZHANG, F, YANG, Y, SMITH, T, KAU, SW, MCCONATHY, JM, ESTEVA, FJ, KUERER, HM, SYMMANS, WF, BUZDAR, AU, HORTOBAGYI, GN and PUSZTAI, L "Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma." **Cancer** 97(7): 1758-1765 (2003).
- ZUNINO, F and CAPRANICO, G "DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines." **Anticancer Drug Des** 5(4): 307-317 (1990).

MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

Polymorphisms of the *TP53* codon 72 in the response to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Brazilian women with inoperable breast cancer.

Running head: Polymorphisms of the *TP53* in the response to chemotherapy in breast cancer.

BSc. Mónica Beatriz Mayorano¹

MSc. Raquel Alves dos Santos¹

Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade²

Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara²

Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi^{1,3}

1. Department of Genetics, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

2. Department of Gynecology and Obstetrics – Breast Disease Division – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

3. Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

Address for correspondence: Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi. Laboratório de Citogenética e Mutagênese (Bloco G), Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. CEP 14040-901. Phone/Fax: +55-16-36023761. E-mail: cstakaha@usp.br

Abstract

The *TP53* gene contains a common single nucleotide polymorphism at codon 72, a proline residue or an arginine residue, which was demonstrated to have a differential apoptosis-inducing potential. Apoptosis plays an important role in the response to drugs and failure to undergo apoptosis is considered a major mechanism of tumor chemo-resistance. Peripheral blood was collected from 120 controls and 116 patients with breast cancer. To estimate the influence of the polymorphism in the response to chemotherapy, 81 patients with inoperable breast cancer submitted to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy were analyzed. The allele frequencies of the *TP53* polymorphism were: Arg=0.65 and Pro=0.35. The genotypic frequencies in breast cancer patients were similar to those of the controls. The distribution of pretreatment patient characteristics was not significantly different among the polymorphic variants. Moreover, the objective response rate (clinical complete or partial response) was 77.8% but only 17.3% achieved good pathological response, defined as a complete pathological response or minimal residual disease. We found that only 8% and 7.2% of patients with the Pro/Pro variant had an objective response and a good pathologic response, respectively, in comparison with the patients heterozygous and homozygous wild-type, but statistical analysis revealed a non significant association. There also was not significant difference between axillary lymph node status among the three genotypes. In our study we were unable to demonstrate any association between *TP53* codon 72 polymorphism and the response to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Brazilian women with inoperable breast cancer.

Keywords: *TP53* gene · Single nucleotide polymorphism · Neoadjuvant chemotherapy · Breast cancer ·

Introduction

Neoadjuvant chemotherapy, also known as primary or preoperative chemotherapy, has been introduced to downstage tumors, thereby facilitating breast conservation and gaining control of probably existing systemic disease [1]. Neoadjuvant chemotherapy permits a rapid assessment of tumor sensitivity to chemotherapy within 3-4 months compared with a follow-up period of more than 5 years to evaluate the sensitivity of adjuvant chemotherapy [2].

Most anticancer agents induce apoptosis in tumor cells. The taxanes and anthracyclines represent the most potent drugs used in breast cancer treatment. The mechanisms of action of anthracyclines in cancer cells are still debated. In spite of the multiple intracellular effects known for the anthracyclines, the inhibition of topoisomerase II seems to be the final molecular event leading to apoptosis [3, 4]. Taxane cytotoxicity is induced by tubulin stabilization and cell cycle arrest. They have been shown to promote apoptosis by several signal transduction pathways, including *TP53* [5].

Protein p53 is a multifunctional transcription factor involved in the control of cell cycle progression, DNA maintenance and genome integrity, repair after DNA damage and apoptosis [6]. It contains a proline-rich sequence with five PXXP motifs, resembling a SH3 binding domain, which is known to be required for p53-induced apoptosis but not for cell cycle arrest [7, 8]. Interestingly, within this domain, there is a common single-base-pair polymorphism at codon 72, resulting in either a proline (Pro) residue (CCC) or an arginine (Arg) residue (CGC) at this position. The two polymorphic variants have been shown to have not only structural differences, as reflected by distinct electrophoresis patterns of migration [9, 10], but also some different biochemical and biological properties [11].

Several studies *in vivo* and *in vitro* have recently highlighted the functional difference between the Pro and Arg variants, with the Arg form of wild-type *TP53* harboring a greater apoptosis-inducing potential than the Pro variant [11-14]. It has been postulated that at least one source of this enhanced apoptotic potential is the greater ability of the Arg form of *TP53* to localize in the mitochondria with a consequent release of cytochrome c into the cytosol [12]. It has been recently demonstrated that the presence of Arg or Pro in codon 72 is crucial for the binding to DNA of ASSP family proteins, which are involved in cell growth and apoptosis during oncogenesis in tumors [15]. Xu et al. [16] found that breast cancer patients with the Pro/Pro variant may be less sensitive to anthracycline-based treatment than those with the Pro/Arg or Arg/Arg variants and suggested that analysis of *TP53* codon 72 polymorphism may provide a simple predictive marker for selecting the breast cancer-prone patients who will respond to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in the clinical setting.

The aim of our study was to investigate the relationship between *TP53* codon 72 polymorphism and the response to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in inoperable breast cancer in a cohort of Brazilian women.

Materials and methods

Casuistic

A total of 116 breast cancer patients and 120 control subjects were admitted in this study from July 2004 to October 2006, but only 81 patients was included to estimate the response to neoadjuvante chemotherapy. The sample was composed of patients with inoperable breast cancer confirmed by incisional biopsy, between 25 and 70 years old. The patients

were submitted to the same taxane- and anthracycline-based neoadjuvant treatment (docetaxel 75 mg/m² and epirubicin 50 mg/m², IV infusion, on day 1, with a 21-day interval for 3 or 4 cycles) at Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto School of Medicine (HCFMRP-USP). Tumor size was defined as longest tumor diameter measured by physical examination and/or mammography and/or ultrasound before therapy. An incisional biopsy was performed before treatment for pathologic diagnosis (histology, histological grade, expression of hormone receptors, mutant p53 and erbB2). The patients' characteristics analyzed are listed in Table 1. Tumor stage was classified according to the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer [17, 18]. This study was approved by the National Ethics Committee (Process N°9106/2003). Patients gave written informed consent prior to enrollment.

DNA extraction and Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) analysis of codon 72 of the *TP53* gene, modified from a technique described by Liu et al. [19], was used to identify *TP53* genotypes. The forward primer used was 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' whereas the reverse primer was 5'-TCTGGGAAGGGACAG-AAGATGAC-3'. Each mixture for PCR (50 µL) contained 0,2 µM of each primer, 2 mM of Mg₂Cl, 200 µM each deoxynucleotide triphosphate, 1 unit of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 100-300 ng of genomic DNA. PCR conditions were initial denaturation at 95°C for 5 min, 95 °C for 1 min and 65 °C for 1 min, followed by 72°C for 1 min, for 35 cycles. The final extension was at 72°C for 8 min. The quality of PCR products (size 199

pb) was confirmed by agarose gel electrophoresis before the enzymatic treatment. Next, each 10 μ L PCR product was digested with 6 units of restriction enzyme *Bst*UI (New England Biolabs Inc.) at 60°C for at least 4 h. The DNA fragments were separated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis and detected by silver staining. The pattern of *Bst*UI digestion was as follows: homozygotes for the Arg allele yielded two smaller fragments (113 and 86 bp); homozygotes for the Pro allele produced a single 199 bp band and the heterozygotes were identified by three bands corresponding to 199, 113 and 86 bp. The genotypes of all patients were determined after they concluded the neoadjuvant chemotherapy.

Assessment of response

Only 81 patients with a complete neoadjuvant treatment were analyzed. The clinical and/or pathological response to preoperative chemotherapy was evaluated about after surgery (no more than 4 weeks after the last cycle), based on macro- and microscopic analysis. The clinical response to treatment, measured and evaluated unidimensionally, was classified as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). This classification was based on the recommended response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) [20]. The patients were grouped into two classes: the objective response group (OR), to which all classified as CR or PR were assigned, and the no response group (NR), containing all patients classified as SD and PD. For the pathological response, the patients were classified into three categories as follows: complete pathological response (pCR), defined as no evidence of residual invasive disease in the breast and lymph nodes; minimal residual disease (MRD), containing all patients with invasive tumors measuring ≤ 1 cm in the breast and negative lymph nodes; and

extensive residual disease (ERD), defined as invasive tumors measuring > 1 cm in the breast or any positive lymph node in the axilla regardless of the size of residual disease in the breast [21].

Statistical analysis

Potential correlations of the measured variables with response to therapy were calculated by Fisher's exact test. All statistical analyses were done using the InStat (GraphPad InStat, version 3.0, GraphPad Software) and the software SigmaStat 1.0 (Jandel Scientific).

Results

In a sample of 236 women (116 patients with breast cancer and 120 controls), the allele frequencies were 0.65 and 0.35 for the Arg and Pro allele, respectively and the polymorphism was shown to be in Hardy-Weinberg equilibrium. In order to assess response to neoadjuvant chemotherapy, detection of *TP53* codon 72 polymorphism by PCR-RFLP was successfully conducted in eighty-one cases. The mean age of the enrolled patients was 49.8 years (range 27-67 years). Fifty-two (44.8%) patients were homozygous for the Arg/Arg genotype, 48 (41.4%) patients were heterozygous for the Arg/Pro genotype, and 16 (13.8%) patients were homozygous for the Pro/Pro genotype. The association between clinicopathological characteristics such as age, tumor size, clinical stage, histology, histological grade, menopausal status, estrogen receptor, progesterone receptor, mutant p53 expression, and erbB2 expression among the three genotypes was carefully analyzed. In this sample, 82.7% (67 of 81) of patients had ductal carcinoma and 56.8% (46 of 81) had tumors which were measuring more than 5 cm. Most tumors (73.6%) were histological grade I or II, 44.5% of patients were post-menopausal and 63.3% of

patients were positive for estrogen receptor. There was no significant difference between the polymorphic variants and the clinicopathologic characteristics (Table 1). Thus, the potential effects of these parameters should not interfere with the response to treatment.

Objective response to preoperative chemotherapy was observed in 92 % of patients; NR was observed in the other patients. Statistical analysis revealed no significant correlation between complete clinical response and the three genotypes (Table 2). pCR was observed in only 6 patients, and MRD in 8 patients, all considered good responders, resulting in an overall rate of 17.3 %. There was also no significant difference between pathological response and the *TP53* codon 72 polymorphism (Table 3). Interestingly, only one patient in the group of good pathologic response (pCR, and MDR) carried the Pro/Pro genotype.

The relationship between the polymorphic variants and the pathologic axillary lymph node response after neoadjuvant chemotherapy was also evaluated. Patients with the Pro/Pro genotype were more likely to have 1-3 positive lymph nodes (66.6%), compared with patients with the Arg/Arg or Arg/Pro variant, but there was no association between the axillary lymph node status and *TP53* codon 72 polymorphism after neoadjuvant chemotherapy (Table 4).

Discussion

Failure to undergo apoptosis is considered a major mechanism of tumor chemoresistance. Some studies have reported that chemotherapy can induce apoptosis in breast cancer [22, 23]. The *TP53* tumor suppressor gene is a key gene in the process of carcinogenesis, as a regulator of cell cycle progression and apoptosis. In particular, the

TP53 codon 72 polymorphism has been extensively studied. The more interesting characteristic of this polymorphism is the differential effect of two alleles, Pro and Arg, on cell growth and apoptosis [12-15]. Taken together, these findings led us to investigate the relationship between *TP53* codon 72 polymorphism and the response to taxane- and anthracyclines-based neoadjuvant chemotherapy in Brazilian women with inoperable breast cancer.

Conflicting results regarding correlation between response to chemo and/or radiotherapy and *TP53* codon 72 polymorphism have been reported. Wegman et al. [24] observed a significantly improved recurrence-free survival in patients carrying the Pro allele when treated with tamoxifen compared to non-tamoxifen treatment, but there was no significant difference when genotype was compared with local recurrence and treatment with radiotherapy or CMF (cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil). Sullivan et al. [14] reported that response rates and survival (both overall and progression-free) were significantly higher in patients whose cancers expressed the Arg allele, and suggested that patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma receiving chemoradiotherapy regimens based on cisplatin, but also containing 5-fluorouracil and taxol, are influenced by the *TP53* codon 72 polymorphism. Bonafe et al. [25] found that retention of the Arg allele was associated with reduction of both disease-free survival and overall survival in Arg/Pro heterozygous patients with breast cancer. Tommiska et al. [26] suggest a significantly reduced survival for Pro homozygous breast cancer patients. Differently from these reports, which evaluated the outcome of adjuvant therapy, we evaluated the response to neoadjuvant chemotherapy. Nevertheless, Fisher et al. [1] showed that pre-operative chemotherapy is as effective as post-operative chemotherapy, but the former allows to assess the responsiveness as an *in vivo* measure of treatment efficacy. Thus, we evaluated the response to neoadjuvant chemotherapy immediately after treatment and

observed an increased frequency of patient with the Pro/Pro genotype, but our statistical analysis revealed a non significant correlation between clinical response rates and the three genotypes.

There is only one previous study associating pathological response and *TP53* codon 72 polymorphism. Xu et al. [16] suggested that breast cancer patients with the Pro/Pro variant may be less sensitive to anthracycline-based treatment than those with the Pro/Arg or Arg/Arg variants. In the present report, there was no significant difference between the three genotypes and the pathologic response, although only one patient with the Pro/Pro genotype had a pCR, showing a tendency in agreement with the possibility of the Pro genotype being less sensitive to chemotherapy [16]. It is important to emphasize that in our sample the overall rate of a good pathologic response (pCR and MRD) was lower (17.3%), probably, due to the percentage of patients (56.8%) with tumor size larger than 5 cm and the number of cycles of neoadjuvant chemotherapy for each patient lower in comparison with other studies [16]. These characteristics, size tumor and number of cycles of chemotherapy, may influence the final number of patients with CR, resulting in a no significant statistical analysis.

Kuerer et al. [27] indicated that the complete histological elimination of invasive disease from the breast, the axillary lymph nodes, or both, after neoadjuvant chemotherapy confers a survival advantage. We analyzed the possibility of nodal status to be associated with Arg or Pro alleles, but we found no significant difference. This may also be associated with tumor size, since the possibility of any patients to have axillary lymph nodes is directly proportional to size tumor.

It is very difficult to state if *TP53* codon 72 polymorphism is a predictive biomarker or not when several factors such as type of therapy, drugs used in chemotherapy, single drug or combined regimens, tumor size, number of cycles of

chemotherapy, intervals between cycles, or even ethnicity might affect the outcome in response to treatment, and this is reflected in the variable results obtained in the different studies. In conclusion, in our study we were unable to demonstrate any association between *TP53* codon 72 polymorphism and the response to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Brazilian women with inoperable breast cancer.

Acknowledgments This research was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 400887/2005-3).

References

1. Fisher, B, Bryant, J, Wolmark, N, Mamounas, E, Brown, A, Fisher, ER, Wickerham, DL, Begovic, M, DeCillis, A, Robidoux, A, Margolese, RG, Cruz, AB, Jr., Hoehn, JL, Lees, AW, Dimitrov, NV and Bear, HD (1998) Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 16:2672-2685
2. Estevez, LG and Gradishar, WJ (2004) Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:3249-3261
3. Zunino, F and Capranico, G (1990) DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5:307-317
4. Gewirtz, DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741
5. Wang, LG, Liu, XM, Kreis, W and Budman, DR (1999) The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 44:355-361
6. Soussi, T and Beroud, C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233-240
7. Walker, KK and Levine, AJ (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15335-15340

8. Sakamuro, D, Sabbatini, P, White, E and Prendergast, GC (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15:887-898
9. Harris, N, Brill, E, Shohat, O, Prokocimer, M, Wolf, D, Arai, N and Rotter, V (1986) Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 6:4650-4656
10. Matlashewski, GJ, Tuck, S, Pim, D, Lamb, P, Schneider, J and Crawford, LV (1987) Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7:961-963
11. Thomas, M, Kalita, A, Labrecque, S, Pim, D, Banks, L and Matlashewski, G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092-1100
12. Dumont, P, Leu, JI, Della Pietra, AC, 3rd, George, DL and Murphy, M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365
13. Pim, D and Banks, L (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108:196-199
14. Sullivan, A, Syed, N, Gasco, M, Bergamaschi, D, Trigiante, G, Attard, M, Hiller, L, Farrell, PJ, Smith, P, Lu, X and Crook, T (2004) Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 23:3328-3337
15. Bergamaschi, D, Samuels, Y, Sullivan, A, Zvelebil, M, Breysens, H, Bisso, A, Del Sal, G, Syed, N, Smith, P, Gasco, M, Crook, T and Lu, X (2006) iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet* 38:1133-1141
16. Xu, Y, Yao, L, Ouyang, T, Li, J, Wang, T, Fan, Z, Lin, B, Lu, Y and Xie, Y (2005) p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 11:7328-7333
17. Singletary, SE, Allred, C, Ashley, P, Bassett, LW, Berry, D, Bland, KI, Borgen, PI, Clark, G, Edge, SB, Hayes, DF, Hughes, LL, Hutter, RV, Morrow, M, Page, DL, Recht, A, Theriault, RL, Thor, A, Weaver, DL, Wieand, HS and Greene, FL (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20:3628-3636
18. Woodward, WA, Strom, EA, Tucker, SL, McNeese, MD, Perkins, GH, Schechter, NR, Singletary, SE, Theriault, RL, Hortobagyi, GN, Hunt, KK and Buchholz, TA (2003) Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 21:3244-3248
19. Liu, G, Miller, DP, Zhou, W, Thurston, SW, Fan, R, Xu, LL, Lynch, TJ, Wain, JC, Su, L and Christiani, DC (2001) Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 61:8718-8722
20. Therasse, P, Arbuck, SG, Eisenhauer, EA, Wanders, J, Kaplan, RS, Rubinstein, L, Verweij, J, Van Glabbeke, M, van Oosterom, AT, Christian, MC and Gwyther, SG (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92:205-216
21. Zhang, F, Yang, Y, Smith, T, Kau, SW, McConathy, JM, Esteva, FJ, Kuerer, HM, Symmans, WF, Buzdar, AU, Hortobagyi, GN and Pusztai, L (2003) Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-

- fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97:1758-1765
22. Ellis, PA, Smith, IE, McCarthy, K, Detre, S, Salter, J and Dowsett, M (1997) Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 349:849
 23. Tiezzi, DG, De Andrade, JM, Candido dos Reis, FJ, Marana, HR, Ribeiro-Silva, A, Tiezzi, MG and Pereira, AP (2006) Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Pathology* 38:21-27
 24. Wegman, P, Stal, O, Askmal, MS, Nordenskjold, B, Rutqvist, LE and Wingren, S (2006) p53 polymorphic variants at codon 72 and the outcome of therapy in randomized breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 16:347-351
 25. Bonafe, M, Ceccarelli, C, Farabegoli, F, Santini, D, Taffurelli, M, Barbi, C, Marzi, E, Trapassi, C, Storci, G, Olivieri, F and Franceschi, C (2003) Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:4860-4864
 26. Tommiska, J, Eerola, H, Heinonen, M, Salonen, L, Kaare, M, Tallila, J, Ristimaki, A, von Smitten, K, Aittomaki, K, Heikkila, P, Blomqvist, C and Nevanlinna, H (2005) Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res* 11:5098-5103
 27. Kuerer, HM, Newman, LA, Smith, TL, Ames, FC, Hunt, KK, Dhingra, K, Theriault, RL, Singh, G, Binkley, SM, Sneige, N, Buchholz, TA, Ross, MI, McNeese, MD, Buzdar, AU, Hortobagyi, GN and Singletary, SE (1999) Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 17:460-469

Table 1. Distribution of variables in a group of 81 patients with breast cancer receiving taxane- and anthracycline-based preoperative chemotherapy and correlation between p53 codon 72 polymorphism and pretreatment patient characteristics.

Variable	n	%	Arg/Arg, n (%)	Arg/Pro, n (%)	Pro/Pro, n (%)	P
Age						
≤ 50 years	41	50,6	16 (45,7)	21 (56,7)	4 (44,4)	0,663
> 50 years	40	49,4	19 (54,3)	16 (43,3)	5 (55,6)	
Tumor Size						
≤ 5 cm	35	43,2	16 (45,7)	15 (40,5)	4 (44,4)	0,948
> 5 cm	46	56,8	19 (54,3)	22 (59,5)	5 (55,6)	
Clinical stage						
II (A and B)	40	49,4	19 (54,3)	17 (45,9)	4 (44,4)	0,737
III (A and B)	41	50,6	16 (45,7)	20 (54,1)	5 (55,6)	
Histology						
Ductal	67	82,7	30 (85,7)	29 (78,4)	88 (88,9)	0,383
Lobular	4	5,0	3 (8,6)	1 (2,7)	0 (----)	
Others	10	12,3	2 (5,7)	7 (18,9)	1 (11,1)	
Histological grade						
I	13	18,0	6 (20,0)	4 (11,8)	3 (37,5)	0,526
II	40	55,6	16 (53,3)	21(61,7)	3 (37,5)	
III	19	26,4	8 (26,7)	9 (26,5)	2 (25,0)	
Not determined	9	-				
Menopausal status						
Pre-menopausal	45	55,5	18 (51,4)	22 (59,5)	5 (55,6)	0,857
Post-menopausal	36	44,5	17 (48,6)	15 (40,5)	4 (44,4)	
Estrogen receptor						
Positive	50	63,3	19 (54,3)	23 (65,7)	8 (88,9)	0,183
Negative	29	36,7	16 (45,7)	12 (34,3)	1 (11,1)	
Not determined	2	-				
Progesterone receptor						
Positive	38	48,1	16 (45,7)	16 (45,7)	6 (66,7)	0,508
Negative	41	51,9	19 (54,3)	19 (54,3)	3 (33,3)	
Not determined	2	-				
p53						
Positive	29	51,8	16 (57,1)	12 (54,5)	1 (16,6)	0,221
Negative	27	48,2	12 (42,9)	10 (45,5)	5 (83,4)	
Not determined	25	-				
c-erb-B2						
Positive	17	27,4	7 (24,1)	8 (29,6)	2 (33,3)	0,773
Negative	45	72,6	22 (75,9)	19 (70,4)	4 (66,7)	
Not determined	19	-				

Table 2. Correlation between p53 codon 72 polymorphism and clinical response after taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy

Clinical Response ^a	Total	Arg/Arg, n (%)	Arg/Pro, n (%)	Pro/Pro, n (%)	<i>P</i> *
OR ^b	63	29 (82,8)	29 (78,4)	5 (55,5)	0,1051
NR ^c	18	6 (17,2)	8 (21,6)	4 (44,5)	

^a Based on RECIST criteria (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor).

^b Objective response.

^c No response.

Table 3. Correlation between p53 codon 72 polymorphism and pathologic response after taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy.

Pathologic Response	Total	Arg/Arg, n (%)	Arg/Pro, n (%)	Pro/Pro, n (%)	<i>P</i> *
ERD ^a	67	29 (82,8)	30 (81,0)	8 (88,9)	1,0000
MRD ^b	8	5 } (17,2)	3 } (19,0)	0 } (11,1)	
pCR ^c	6	1 }	4 }	1 }	

^a Extensive residual disease.

^b Minimal residual disease.

^c Complete pathological response.

Table 4. Correlation between p53 codon 72 polymorphism and axillary lymph node status after neoadjuvant chemotherapy.

Metastatic lymph nodes	Total	Arg/Arg, n (%)	Arg/Pro, n (%)	Pro/Pro, n (%)	<i>P</i>
0	37	17 (48,6)	18 (48,6)	2 (22,2)	0,3023
1-3	27	11 (31,4)	10 (27,0)	6 (66,6)	0,0929
≥ 4	17	7 (20,0)	9 (24,4)	1 (11,2)	0,7956

ANEXOS



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2003


Ofício nº 3025/2003
CEP/CDGC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **“DETERMINAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 165ª Reunião Ordinária realizada em 06/10/2003, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, **bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9106/2003. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.


PROFª DRª CLARISSE DULCE G. CARVALHEIRO
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

Mem. nº 13/2004
GS-3/LHBS

Ribeirão Preto, 21 de janeiro de 2004


Ilustríssima Senhora
MÔNICA BEATRIZ MAYORANO
Profª Drª Catarina Satie Takahashi (Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP
Laboratório de Citogenética e Mutagênese
Em mãos

Prezada Senhora:

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 093/2004 – CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“DETERMINAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA”**, de acordo com o Processo HCRP nº 9106/2003.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.
Aproveito a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente.


LAÍS HELENA BORGES DA SILVEIRA
Diretora do Serviço de Comunicações
Administrativas
R.F. nº 1373

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: DETERMINAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mônica Beatriz Mayorano

Prezada doadora, sabe-se que o câncer de mama é uma doença que atinge um grande número de mulheres e que parte do tratamento inclui o uso de medicamentos que agem sobre o tumor. Cada indivíduo possui no seu DNA características que o fazem único e que pode responder de jeito diferente aos remédios que são utilizados nos tratamentos das diferentes doenças. O objetivo deste projeto é estudar se há uma relação entre as variações em alguns genes na população brasileira e a resistência aos medicamentos utilizados no tratamento do câncer de mama.

Para a realização dessa pesquisa será necessária a participação de mulheres com câncer de mama tratadas com diversos remédios e mulheres sãs, que serão utilizadas como controle na pesquisa. Caso concorde em contribuir com este estudo serão retirados 20 ml de sangue, o mesmo será colhido pelo pessoal treinado para tal fim, utilizando material descartável, sendo que uma picadinha de agulha é o único desconforto a que será submetida. O material será guardado em tubos rotulados sem nomes, de modo que nenhuma doadora possa ser identificada, mantendo o caráter confidencial da informação, sendo simplesmente um número de identificação o único citado em tese ou trabalhos científicos produzidos por esta pesquisa. Uma vez acabada a investigação, ou caso de não continuar participando da mesma, o material será descartado, não podendo ser utilizado para nenhum outro fim. Em todo momento, a informação obtida estará disponível caso a doadora queira ter os resultados da análise.

Sua participação não trará nenhum prejuízo à continuidade de seu tratamento, bem como também não será remunerada nem terá nenhum gasto pela mesma, estando livre para retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

ANEXOS

EU _____
_____, R.G. nº: _____, abaixo assinado,
tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados,
concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao meu tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

ANEXOS

Tabela 1. Classificação Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) utilizada para a caracterização do câncer de mama pela União Internacional Contra o Câncer (UICC).

Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	≤ 2 cm		
T1mic	≤ 0,1 cm		
T1a	> 0,1 cm até 0,5 cm		
T1b	> 0,5 cm até 1 cm		
T1c	> 1 cm até 2 cm		
T2	> 2 cm até 5 cm		
T3	> 5 cm		
T4	Parede torácica/pele		
T4a	Parede torácica		
T4b	Edema/ulceração cutânea, nódulos cutâneos satélites		
T4c	Ambos T4a e T4b		
T4d	Carcinoma inflamatório		
N1	Linfon. axilares móveis	pN1mi	Micrometástase, > 0,2 mm ≤ 2mm
		pN1a	1-3 linfonodos axilares
		pN1b	Linfonodos mamários internos com metástase microscópica por biopsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
		pN1c	1-3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biopsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
N2a	Linfonodos axilares fixos	pN2a	4-9 linfonodos axilares
N2b	Linfon. mamários internos, clinicamente aparentes	pN2b	Linfonodos mamários internos, clinicamente parentes, sem linfonodos axilares
N3a	Linfon. infra-claviculares	pN3a	> 10 linfonodos axilares ou infra-claviculares
N3b	Linfon. mamários internos e axilares	pN3b	Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, com linfonodo(s) axilar(es) ou > 3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biopsia de linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente
N3c	Linfon. supra-claviculares	pN3c	Linfonodos supraclaviculares

Tabela 2. Classificação segundo a AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Estadiamento 0	Tis, N0, M0
Estadiamento I	T1, N0, M0
Estadiamento IIA	T0, N1, M0 / T1, N1, M0 / T2, N0, M0
Estadiamento IIB	T2, N1, M0 / T3, N0, M0
Estadiamento IIIA	T0, N2, M0 / T1, N2, M0 / T2, N2, M0 / T3, N1, M0 / T3, N2, M0
Estadiamento IIIB	T4, N0, M0 / T4, N1, M0 / T4, N2, M0
Estadiamento IIIC	Qualquer T, N3, M0
Estadiamento IV	Qualquer T, qualquer N, M1

Tabela 3. Escala de subdivisão dos carcinomas na determinação do grau histológico.

Formação tubular	Escala (pontos)
Maioria do tumor (> 75 %)	1
Grau moderado (10 % - 75 %)	2
Pouca ou nenhuma (< 10 %)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeno, regular e uniforme	1
Moderado aumento no tamanho e variabilidade	2
Varição marcante, nucléolo presente	3
Contagem mitótica	
Índice baixo (0 - 10 / 10 CGA)	1
Índice moderado (11 - 20 / 10 CGA)	2
Índice alto (> 21 / 10 CGA)	3
Graus*: I (3 a 5), II (6 e 7) e III (8 e 9)	

* O somatório dos pontos determinados na escala define o grau histológico da classificação de Scarff, Bloom e Richardson [1], modificada por Elston e Ellis [2]:

- 3-5 pontos: **grau I** ou bem diferenciado;
- 6-7 pontos: **grau II** ou moderadamente diferenciado;
- 8-9 pontos: **grau III** ou pouco diferenciado.

Tabela 4. Caracterização das doenças diagnosticadas nas pacientes do ambulatório de mastologia utilizadas como controles na nossa amostra.

ID	Diagnóstico
001C	Hiperplasia ductal típica e alterações fibrocísticas da mama
002C	Cistos mamários
003C	Fibroadenoma
004C	Nodulação típica
005C	Tecido fibrogranular e densidade assimétrica
006C	Hiperplasia ductal sem atipias e fibroadenoma
007C	Cistos mamários
008C	Mama acessória
009C	Microcalcificações agrupadas
010C	Doença fibrocística da mama e microcalcificações
011C	Calcificações de aspecto benigno
012C	Microcalcificações
013C	Fibroadenoma
014C	Microcalcificações agrupadas
015C	Fibroadenoma
016C	Cisto mamário
017C	Tecido fibroadiposo compatível com tecido mamário acessório
018C	Microcalcificações e atrofia mamária
019C	Cistos mamários
020C	Doença fibrocística da mama
021C	Ectasia ductal bilateral
022C	Ectasia ductal bilateral
023C	Mamilo umbilicado. Mastite crônica
024C	Mama supranumerária axilar
025C	Papiloma intracístico associado a fibrose e focos de lobulite crônica
026C	Lipoma
027C	Fibrose, adenose, cistificação e hiperplasia ductal sem atipias
028C	Ectasia ductal. Absceso subareolar
029C	Ectasia ductal. Absceso subareolar
030C	Cistos bilaterais
031C	Múltiplos cistos mamários
032C	Microcalcificações agrupadas
033C	Ectasia, hiperplasia ductal sem atipias e alterações fibrocísticas
034C	Fibroadenoma hialinizado
035C	Ectasia ductal e mastite crônica
036C	Cisto mamário simples
037C	Ectasia ductal bilateral
038C	Alterações fibrocísticas da mama
039C	Fibroadenoma
040C	Cisto mamário
041C	Alterações fibrocísticas da mama
042C	Microcalcificações monomórficas
043C	Múltiplos cistos mamários
044C	Cistos mamários
045C	Fibroadenoma associado a alterações fibrocísticas da mama
046C	Ausência de sinais de malignidade
047C	Alterações fibrocísticas benignas e focos de calcificação

ID	Diagnóstico
048C	Doença fibrocística da mama
049C	Fibroadenoma
050C	Calcificações de aspecto benigno
051C	Sem evidencias de lesões suspeitas
052C	Cistos mamários bilaterais
053C	Papilomatricoma
054C	Exame dentro dos limites da normalidade
055C	Microcalcificações
056C	Parênquima mamário dentro dos limites histológicos de normalidade
057C	Sem evidencias de lesões suspeitas
058C	Fibroadenoma
059C	Múltiplos cistos bilaterais
060C	Fibroadenoma hialinizado
061C	Cistos mamários bilaterais
062C	Sem evidencias de lesões suspeitas
063C	Ausência de sinais de malignidade
064C	Parênquima mamário com focos de fibrose
065C	Fibroadenoma intracanalicular totalmente ressecado
066C	Fibroadenoma
067C	Parênquima mamário com adenose e fibrose
068C	Lesão epitelial proliferativa maligna
069C	Fibroadenoma
070C	Necrose gordurosa
071C	Fibroadenoma
072C	Alterações fibrocísticas da mama
073C	Alterações fibrocísticas da mama
074C	Fibroadenoma
075C	Cistos benignos
076C	Alterações fibrocísticas da mama
077C	Cistos benignos
078C	Fibroadenoma
079C	Mamas parcialmente lipossubstituídas
080C	Mama supranumerária
081C	Hipotrofismo mamário
082C	Fibroadenoma
083C	Parênquima mamário dentro dos padrões histológicos de normalidade
084C	Alterações fibrocísticas da mama
085C	BIRADS II
086C	BIRADS II
087C	Exame dentro dos limites da normalidade
088C	Exame dentro dos limites da normalidade
089C	Sem evidencias de lesões suspeitas
090C	Alterações fibrocísticas da mama
091C	Fibroadenoma hialinizado
092C	Alterações fibrocísticas e adenose esclerosante
093C	Fibroadenoma
094C	Alterações fibrocísticas da mama
095C	Fibroadenoma com focos de degeneração hialina
096C	Alterações fibrocísticas da mama
097C	Hipertrofia mamária com fibrose, adenose e cistificação ductal
098C	Parênquima mamário dentro dos padrões histológicos de normalidade
099C	Fibroadenoma de padrão peri-canalicular
100C	Fibroadenoma

ID	Diagnóstico
101C	BIRADS II
102C	Hiperplasia ductal típica com focos de adenose esclerosante
103C	Fibrose estromal
104C	Fibroadenoma intracanalicular sem sinais de malignidade
105C	Exame dentro dos limites da normalidade
106C	Fibroadenoma
107C	Microcalcificações
108C	Fibroadenoma
109C	Fibroadenoma
110C	Nódulo benigno. BIRADS III
111C	BIRADS III
112C	Abscesso mamário
113C	Tecido mamário ectópico. Mama supranumerária
114C	Ptose mamária
115C	Fibroadenoma
116C	Adenose simples e mastite crônica
117C	Fibroadenoma
118C	Parênquima mamário com fibrose estromal
119C	Hipotrofismo mamário
120C	Fibroadenoma