

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Taís Frederes Krämer Alcalde**

**ANÁLISE DA PERDA DE  
HETEROZIGOSIDADE DO GENE  
*FHIT* NO TECIDO TUMORAL DE  
PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA**

**UFCSPA**  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre**

**2014**

Taís Frederes Krämer Alcalde

**ANÁLISE DA PERDA DE  
HETEROZIGOSIDADE DO GENE  
*FHIT* NO TECIDO TUMORAL DE  
PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Cláudio O. Alexandre

Co-orientadora: Adriana Roehe

Porto Alegre

2014

## Agradecimentos

Por mais complicados que pareçam os caminhos, devemos sempre continuar fiéis àquilo que acreditamos. Porém, às vezes, isso não é o bastante para que permaneçamos trilhando essa via e, muitos, acabam desistindo. Precisamos de apoio, carinho, atenção e compreensão daqueles que nos redeiam, pois isso nos dá forças para continuar e vencer cada batalha.

Eu sou uma pessoa de muita sorte. Sou rodeada de pessoas maravilhosas. Com elas aprendi muitas coisas e, sem elas, eu nada seria.

Fazer mestrado, ainda mais numa Universidade de tanto prestígio, como é a UFCSPA, sempre foi uma vontade. Fiquei extasiada quando passei na seleção: era um mundo novo que se abria a minha frente.

Não posso deixar de agradecer aqueles que foram de importância para que eu conseguisse concluir tal etapa: aos professores, em especial à Professora Adriana Roehe, pessoal do laboratório e da secretaria do PPG

À minha mãe, agradeço todo o apoio e zelo, as demonstrações ímpares de que, quando queremos alguma coisa, temos que passar, às vezes, por muitas situações difíceis. Aprendi, desde pequena, que não devemos lutar por aquilo que acreditamos, pois, aí sim, colheremos frutos mais doces.

Agradeço ao meu pai que, mesmo sem perceber ou acreditar, plantou em mim uma semente de curiosidade insaciável. Sendo assim, não descanso até encontrar uma resposta.

Ao meu irmão, Bernardo, pessoa incrível, de uma sabedoria ímpar, dando sempre conselhos formidáveis.

Às minhas filhas, Lilica e Mika, que sempre estiveram “estudando” comigo. Desde o início da faculdade, pela pós, até o mestrado. Agradeço por tudo o que me ensinaram em tão pouco tempo de existência. Mesmo que, hoje, vocês já tenham virado estrelas no céu, eu nunca vou esquecer as tardes/noites de estudo ao lado de vocês duas.

E por último, agradeço ao Sandro, meu grande amor: sem você nada disso seria possível. Sempre me apoiando e aguentando minhas crises de mal humor, com uma paciência invejável, dando idéias sobre assuntos complicados e fora de sua área, sempre me auxiliando da melhor maneira possível e me dizendo que tudo ia dar certo. E, realmente, deu!

E mais um ciclo que chega ao fim. Agora, devo descobrir qual será a próxima etapa.

## Listagem de Abreviaturas

3p: região do braço curto do cromossomo

*BRCA1: Breast Cancer 1, Early onset*

*BRCA2: Breast Cancer 2, Early onset*

CDI: Carcinoma ductal invasor

CDIS: Carcinoma ductal in situ

CLI: Carcinoma lobular invasor

CLIS: Carcinoma lobular in situ

DNA: Ácido desoxirribonucléico

FHIT: Tríade da Histidina Frágil (em inglês, Fragile Histidine Triad)

GHC: Grupo Hospitalar Conceição

HF: Hospital Fêmeina

*IARC: International Agency for Research on Cancer*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Kb: kilobases

LOH: Perda de Heterozigosidade (em inglês, Loss of Heterozygosity)

ROH: Retenção da Heterozigosidade (em inglês, Retention of Heterozygosity)

SOE: Carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação

UICC: União Internacional Contra o Câncer kDa

**ÍNDICE**

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 O CÂNCER DE MAMA	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Classificação	4
1.1.3 Fatores de Risco e Fatores Prognósticos	7
1.2 O GENE FHIT (FRAGILE HISTIDINE TRIAD)	10
1.3 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM TUMORES	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5. ANEXOS	36

#### Catálogo na Publicação

Alcalde, Taís Frederes Krämer

ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE FHIT NO  
TECIDO TUMORAL DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA / Taís  
Frederes Krämer Alcalde. -- 2014.

45 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de  
Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Orientador(a): Cláudio Osmar Alexandre ;  
coorientador(a): Adriana Roehe.

1. Biologia molecular. 2. Câncer de mama. I. Título.

# ÍNDICE

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 O CÂNCER DE MAMA	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Classificação	4
1.1.3 Fatores de Risco e Fatores Prognósticos	7
1.2 O GENE FHIT (FRAGILE HISTIDINE TRIAD)	10
1.3 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM TUMORES	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5. ANEXOS	36

## RESUMO

**Introdução.** Alterações envolvendo a região 3p14, no sítio que contém o gene *FHIT*, têm sido observadas com frequência nos tumores de mama. **Objetivo.** Neste estudo avaliamos a perda de heterozigosidade (LOH) para o marcador intragênico D3S1300 no gene *FHIT* em amostras de tecido de 42 de pacientes com carcinoma de mama e a relacionamos com fatores de risco, fatores prognósticos/preditivos e com o tempo de sobrevida. **Material e Métodos:** Foram analisadas amostras de tecido tumoral e de tecido mamário não neoplásico, obtidas de pacientes do sexo feminino com diagnóstico de carcinoma mamário. Utilizou-se a técnica de PCR para a amplificação do marcador D3S1300, seguida de eletroforese capilar no equipamento ABI-PRISM 3130 e análise através do software GeneMapper. **Resultados.** A LOH foi detectada em 24,3% (10/41) das amostras informativas. Não houve diferenças significativas entre os resultados de LOH e os fatores de risco examinados. Não foram encontradas diferenças na análise em relação a expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona (RE e RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). Quando analisamos o resultado da LOH em relação aos fatores prognósticos observamos que a LOH foi significativamente maior nos pacientes com presença de invasão vascular ( $p=0,049$ ). Contudo, a sobrevida global e livre de doença, por um período de 48 meses, não mostrou diferenças significativas em relação à LOH ( $P=0,43$ ;  $P=0,860$ ). **Conclusão.** A frequência de LOH para o gene *FHIT*, observada em nosso estudo, está dentro da amplitude relatada em outras populações de pacientes com câncer de mama. A frequência de LOH foi significativamente relacionada com a presença de invasão vascular, considerada fator de mau prognóstico para o câncer de mama.

**Palavras-chave:** Breast cancer, LOH, *FHIT* gene, risk and prognostic factors

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama ocupa o segundo lugar na incidência de neoplasias, sendo a malignidade não-cutânea mais comum em mulheres. Atualmente, representa um em cada dez casos de câncer diagnosticados no mundo e é a principal causa de morte em mulheres européias (Kamangar e cols., 2006).

Trata-se de uma enfermidade heterogênea de caráter multifatorial, desencadeada, fundamentalmente, pela perda de equilíbrio entre a atividade de oncogenes e genes supressores de tumor que resulta na alteração do controle da proliferação celular.

Em países desenvolvidos, a incidência deste tipo de câncer tem aumentado ao mesmo tempo em que se observa uma redução da mortalidade. Diferentemente, no Brasil o aumento da incidência está associado a um aumento da mortalidade, o que pode ser reflexo, principalmente, de diagnósticos tardios (INCA, 2014). Considerando este fato, é de grande importância a pesquisa de marcadores biomoleculares que possibilitem desenvolver novas abordagens que contribuam para o diagnóstico precoce, com reflexos no sucesso do tratamento.

## 1.1 O câncer de mama

### 1.1.1. Epidemiologia

No Brasil, segundo a publicação “*Estimativa 2014- Incidência de câncer no Brasil*”, lançada pelo INCA, espera-se, aproximadamente, 190.520 mil novos casos de câncer (exceto pele não-melanoma) em mulheres, sendo que 57.120 mil são relativos aos tumores de mama. Entre os estados brasileiros, o Rio Grande de Sul apresenta uma incidência extremamente elevada de 87,72 casos a cada 100 mil mulheres. Esta é ainda maior em sua capital, Porto Alegre, onde a incidência é de 146,36 para cada 100 mil mulheres (Kamangar e cols., 2006; INCA, 2014). A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer, em mulheres, são de mama (INCA, 2014).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, as taxas de incidência do conjunto de tumores são cerca de duas vezes maiores nas regiões Sul e Sudeste do que nas regiões Norte e Nordeste (Fig.1). Em nosso País, há mais de 20 anos, o câncer de mama é o tumor maligno mais frequente e o de maior mortalidade. Apenas a região Norte foge desse padrão, sendo o câncer de colo do útero o mais comum (INCA, 2014).

A neoplasia mamária tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ainda ser estabelecido na maioria das vezes, numa fase tardia da doença, em especial junto às classes com menor poder aquisitivo. Uma das causas no retardo do diagnóstico pode ser o reflexo da inexistência de uma política consistente de controle da doença através do diagnóstico precoce (Harris, 2013).

Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, a mortalidade por câncer de mama continua elevada no Brasil. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que nos países desenvolvidos a sobrevida aumenta para 73%, enquanto que, nos países em desenvolvimento esta é de 57%

(INCA, 2014). Por esta razão, é importante desenvolver novas abordagens que possam contribuir para o sucesso terapêutico.

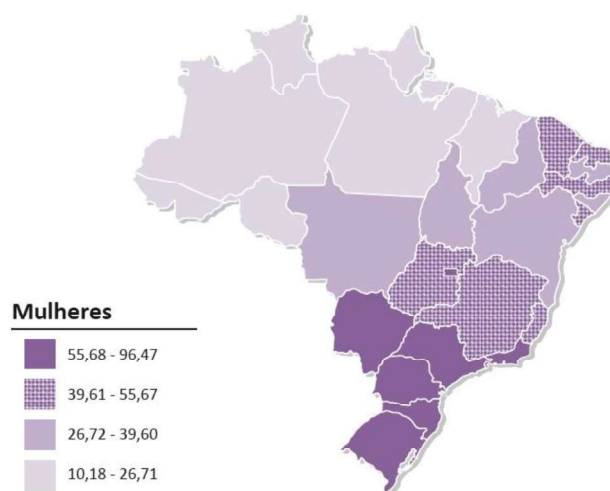


Fig. 1 Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação.

### 1.1.2. Classificação

A carcinogênese mamária é um processo complexo, sendo que aproximadamente 90% dos tumores de mama ocorrem nos ductos ou nos lóbulos. O carcinoma ductal e o carcinoma lobular, respectivamente, podem ser invasivos, caso rompam os limites da estrutura e atinjam os tecidos vizinhos, ou *in situ*, caso permaneçam contidos em suas estruturas de origem (Kumar, Abbas, Fausto, Robbins, Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças, 2005).

Entre 80 e 90% dos carcinomas mamários são do tipo carcinoma ductal invasor (CDI) e seu diagnóstico é feito por exclusão, ou seja, quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinoma mamário, sendo classificado

como carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE). Os outros carcinomas ductais de tipo especial compreendem 10 a 20% dos carcinomas invasivos e apresentam, de maneira geral, melhor prognóstico (Burstein e cols., 2004). São eles:

- Carcinoma tubular
- Carcinoma cribriforme
- Carcinoma com características medulares
- Carcinoma metaplásico
- Carcinoma com diferenciação apócrina
- Carcinoma adenoide cístico
- Carcinoma mucoepidermoide
- Carcinoma polimorfo
- Carcinoma mucinoso e carcinoma com células em anel de sinete
- Carcinoma com características neuroendócrinas
- Carcinoma papilífero invasivo
- Carcinoma micropapilífero invasivo
- Carcinoma secretor
- Carcinoma oncocítico
- Carcinoma sebáceo
- Carcinoma rico em lipídeos
- Carcinoma de células claras rico em glicogênio
- Carcinoma de células acinares

O tipo carcinoma lobular invasor (CLI) compreende de 10 a 14% dos carcinomas mamários. A idade média das mulheres que apresentam este tipo de tumor

varia de 45 a 56 anos. O CLI é freqüentemente multifocal e/ou multicêntrico, sendo a bilateralidade descrita em 6 a 28% dos casos (Anderson e cols., 2013).

O tipo carcinoma ductal *in situ* (CDIS), também chamado de intraductal, distingue-se por uma proliferação de células malignas que não ultrapassa os limites da membrana basal do ducto, não invadindo o estroma. É importante assinalar que, à medida que a lesão progride, estendendo-se através da membrana basal, transforma-se em um carcinoma invasor. A incidência desse tipo de tumor, com o uso de novas tecnologias de rastreamento mamográfico, aumentou bastante nas mulheres acima de 50 anos na última década. O CDIS é considerado uma lesão precursora, isto é, tem cerca de 40% de chances de evoluir para carcinoma invasivo se não tratado, porém, ainda não é possível prever acuradamente qual a taxa de progressão do carcinoma ductal *in situ* para carcinoma invasor (Cowell e cols., 2013).

Descrito nos anos 40, o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) tem uma incidência baixa, representando em vários estudos 0,5 a 3,6% dos espécimes de biópsias de mama analisadas. É encontrado em mulheres com idade média de 45 anos, sendo que 80 a 90% dos casos são observados em pré-menopáusicas. O CLIS tem uma evolução bastante variável, sendo que cerca de 20 a 30% das pacientes apresentarão desenvolvimento de carcinoma infiltrante em 15 anos. Por essa razão, o CLIS é considerado uma lesão de risco para câncer de mama, e é reconhecido como um tipo de “marcador” que identifica mulheres com alto risco para o desenvolvimento de carcinoma invasivo (Menke e cols., Rotinas em Mastologia, 2007).

A classificação completa, revisada e ampliada dos tumores de mama da Organização Mundial da Saúde foi publicada pela “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC), no ano de 2012 (ANEXO A).

### 1.1.3. Fatores de risco e fatores prognósticos

O curso clínico da doença e a sobrevida podem variar de paciente para paciente, sendo que essa variação pode estar associada a uma série de fatores. Atualmente, diversos destes fatores associados à susceptibilidade dessa doença já foram identificados.

Os chamados fatores de risco representam situações que aumentam a chance da mulher desenvolver esta neoplasia. Os fatores de risco já estabelecidos para essa neoplasia são: idade, etnia, histórico familiar e histórico pessoal de câncer, aqueles relacionadas a vida reprodutiva da mulher como menarca precoce (antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 50 anos), nuliparidade, idade na primeira gestação, tempo de lactação e realização de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se por mais de cinco anos (Willet e cols., 2000; Tiezzi, 2009).

Sabe-se que a incidência de câncer de mama aumenta conforme a idade, sendo assim, raramente encontrado em mulheres jovens, salvo em certos casos familiares. Cerca de 1 em 8 tipos invasivos de câncer são encontrados em mulheres com menos de 45 anos, enquanto que 2 em cada 3 casos notificados são em mulheres com mais de 55 anos (Willet e cols., 2000; Yang e cols., 2002).

Estudos epidemiológicos mostram que as mulheres caucasianas apresentam uma maior incidência do tumor de mama, enquanto mulheres negras tendem a apresentar, por causas não bem esclarecidas, formas mais agressivas dessa neoplasia (MacMahon, 2006).

Embora pacientes com um histórico de câncer de mama em parentes próximos representem cerca de 5% a 10% de todos os tipos de casos dessa neoplasia, a história familiar é uma ferramenta essencial para identificar e derivar pacientes em risco de

desenvolver este tipo de tumor (Veronesi e cols., 2005). A identificação de famílias nas quais existe um padrão hereditário de câncer é imprescindível para o desenvolvimento de esquemas de acompanhamento e monitoramento.

O risco relativo de desenvolver câncer de mama aumenta de acordo com o grau de parentesco, número de membros afetados, precocidade do aparecimento do tumor e se esse for bilateral no parente afetado. A presença de um parente em primeiro grau afetado (mãe, irmã ou filha) aumenta em 1,5 a 2 o risco (Hankinson e cols., 2004). Os tumores de origem hereditária tendem a surgir em idade mais precoce e, frequentemente, acometem ambas as mamas (Lippman e cols., 1987).

Genes supressores tumorais como o *BRCA1* e o *BRCA2* são os mais comumente relacionados a tumores hereditários na mama . Mutações nesses dois genes conferem um risco cumulativo, respectivamente de 65 ou 39% para esta neoplasia (Wooster e cols., 1994; Antoniou e cols., 2003).

Mulheres com história menstrual longa, que apresentam menarca precoce (antes dos 12 anos de idade) ou menopausa tardia (após os 50 anos de idade) também apresentam um risco maior para o desenvolvimento do câncer de mama. Estima-se que a cada ano em que a menarca ocorra mais tardiamente, o risco diminui cerca de 10 a 20%. Presume-se que este efeito se deva ao maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno. Esse hormônio, além de ativar a proliferação das células do tecido mamário, possivelmente possui um efeito anti-apoptótico, impedindo a destruição de células que sofreram danos no DNA que afetam genes importantes envolvidos no controle do ciclo celular (Henderson e cols., 1991; Parkin e cols., 2001)

O efeito protetor da gravidez tem sido evidenciado em vários estudos que mostram que a cada gestação o risco diminui e que o tempo prolongado de amamentação também é um importante fator protetor para o câncer de mama (Pérez-

Escamilla e cols., 2004; Albrektsen e cols., 2005). Em experimentos com murinos, ficou evidenciado que animais nulíparos eram mais suscetíveis ao efeito de substâncias carcinogênicas, capazes de induzir tumores mamários, quando comparados com animais com gestações completas. A maior suscetibilidade daqueles animais em desenvolver câncer de mama parece ser o resultado da complexa interação entre a substância carcinogênica e as células em processo de intensa proliferação celular nos tecidos das estruturas ainda não diferenciadas da glândula mamária (Tay e cols., 1981; Russo e cols., 2005),

O estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, aumenta o risco quanto maior for o tempo de exposição. O uso de terapias de reposição hormonal é considerado um fator de risco para o câncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; Beral e cols., 2003). Segundo este estudo, o risco aumenta proporcionalmente ao tempo de uso do hormônio em reposição. Também, o uso de anticoncepcionais orais, é descrito como fator de risco, porém ainda não existe consenso sobre esta questão (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996). Aliados, progestogênio e estrogênio elevam ainda mais o risco. O estrogênio, ao induzir o crescimento das células do tecido mamário, aumenta o potencial de alterações genéticas e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária (Li e cols., 2002).

Os denominados fatores prognósticos são parâmetros que servem como preditor da sobrevida do paciente. O prognóstico da paciente com câncer de mama varia bastante. Deve-se, porém, fazer uma distinção entre fatores prognósticos e preditivos: enquanto o fator prognóstico pode ser definido como uma variável mensurável que se correlaciona com a história natural da doença, o fator preditivo está associado com a

resposta à terapia dada. Alguns fatores, como *status* dos receptores de estrógeno/receptores de progestogênio (ER/PR), são tanto prognósticos como preditivos (Masood, 2005; INCA, 2010).

Tanto o estadiamento do tumor como o grau de diferenciação histológica são classificações bastante empregadas na clínica, constituindo-se em importantes ferramentas na orientação terapêutica. O sistema de estadiamento mais utilizado é o indicado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), que denomina-se Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos Brasil (Ministério da Saúde, 2004). Este sistema é baseado na extensão anatômica da enfermidade, observando as características do tumor primário, a presença de linfonodos no órgão em que o tumor se localiza e a existência ou não de metástases à distância.

O sistema de graduação histológica do câncer de mama recomendado pela Organização Mundial de Saúde (Scarf e Torloni, 1968) baseia-se em critérios relacionados à presença de formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. A classificação chamada de Modificação de Nottingham do sistema de Bloom-Richardson (Elston e Ellis, 1991) pode ser observada no ANEXO B.

## **1.2. O gene *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*)**

O gene *FHIT* está localizado no braço curto do cromossomo 3, na região 3p14.2, e contém o sítio frágil FRA3B. Esse sítio tem sido de grande interesse por ser o sítio frágil mais ativo e por estar localizado numa banda cromossomal que é frequentemente deletada em inúmeros tumores sólidos (Ohta e cols., 1996). Considerado o segundo maior gene que compõe o genoma humano, possuindo, aproximadamente, 1,8 megabases (Mb), esse gene contém 10 éxons, dos quais cinco

(éxons 5 a 9) são responsáveis pela codificação de um pequeno mRNA (1,1kb) que expressa um polipeptídeo de 147 aminoácidos (16,8 kDa) encontrado, principalmente, no citoplasma das células epiteliais (Figura 2).

Estudos mostraram que este gene pertence à família de genes caracterizados pela tríade da histidina e que seu produto possui grande homologia com a enzima Ap4A (diadenosina-tetrafosfato-hidrolase) presente no fungo *S. Pombe* (Bednarek e cols., 2000) . Análises *in vitro* evidenciaram que a proteína tem uma atividade típica das adenosinas-trifosafato-hidrolase (Ap3A). As proteínas com função ApnA, em eucariotos superiores, estão associadas, fundamentalmente, ao controle do crescimento celular (Huebner e cols., 1998).

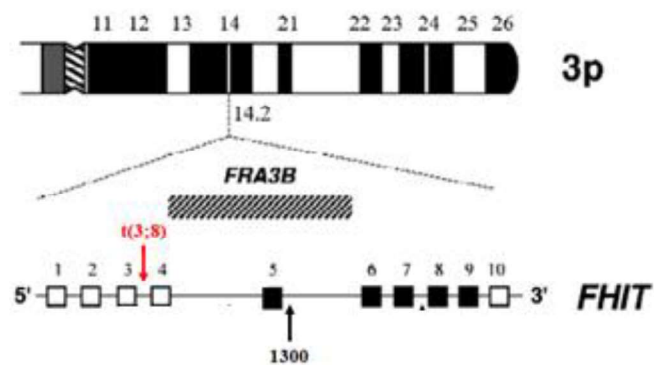


Figura 2. Região do gene *FHIT* no cromossomo 3p14.2. A barra tracejada representa a localização do sítio frágil *FRA3B*. Os éxons estão numerados de 1 a 10 sendo que a região codificante está corada em preto. A seta preta indica a localização do marcador de microsátélites D3S1300. A seta vermelha mostra o ponto de quebra da translocação *t(3;8)(p14.2;q24)*, que é associada ao tumor renal familiar (Figura adaptada de Pekarsky e cols., 2002).

Os éxons 3, 4 e 5 estão muito próximos à translocação t(3;8) que é associada ao tumor familiar de rim e onde se localiza um cluster de sítios frágeis (Barnes e cols., 1996). Essa descoberta inicial, suscitou uma discussão em torno da questão de o *FHIT* ser mesmo um gene supressor envolvido no processo de carcinogênese, ou se suas alterações frequentes eram meramente devidas a efeitos relacionados a sua localização.

Porém, ao longo dos anos, foram surgindo evidências fortes para sustentar a idéia de que o *FHIT* é de fato um gene supressor tumoral (Wali, 2010). Uma das evidências foi demonstrada pela geração de camundongos *knockout*. Animais heterozigotos (*FHIT*<sup>+/-</sup>) e homozigotos (*FHIT*<sup>-/-</sup>) apresentaram maior incidência de tumores espontâneos e maior susceptibilidade a substâncias carcinogênicas (Fong e cols., 2000).

É importante assinalar que as deleções são os eventos mutacionais mais freqüentemente observados no gene *FHIT*, principalmente em tumores epiteliais mais expostos a fatores carcinogênicos, como o câncer de estômago e de pulmão, e carcinoma cervical, sendo raros os eventos de mutações pontuais (Gatalica e cols., 2000).

Vários autores descreveram alterações do gene *FHIT* no câncer de mama esporádico e em lesões pré-neoplásicas. Gatalica e cols. (2000) e Yang e cols. (2002) avaliaram a expressão deste gene, por meio de testes imunohistoquímicos, em lesões epiteliais e em tumores de mama invasivos. Estes estudos evidenciaram que, enquanto no epitélio lobular e ductal o produto deste gene era detectado de maneira constante, na maioria dos tumores não havia detecção ou ela era muito tênue.

A inativação desse gene pode estar intimamente relacionada com a progressão e agressividade do câncer de mama, sendo detectada a redução ou a ausência da expressão deste gene em até 80% dos tumores de mama invasivos (Guler e cols., 2005). Este

fenômeno normalmente envolve mutação de um alelo e perda ou troca de um segmento cromossômico contendo o outro alelo.

### 1.3. Perda de Heterozigosidade em tumores

O fenômeno biológico denominado de Perda de Heterozigosidade (*Loss of Heterozygosity* – LOH) pode ser definido como a perda de um alelo em um locus específico, resultando em um hemizigoto anormal. Este fenômeno pode ser causado pela perda de material genético envolvendo apenas uma região cromossômica ou o cromossomo inteiro, recombinação mitótica entre homólogos ou translocação (Brown, 1997).

A inativação de um alelo funcional num locus heterozigoto ganhou um novo significado nos estudos em câncer, à medida que o conceito de genes supressores tumorais e sua significância foram aparecendo. Essas idéias provêm de um estudo dos anos 80 com pacientes com predisposição ao retinoblastoma (Cavenee e cols., 1983). A inativação de genes supressores de tumor usualmente envolve a mutação com perda de função de um alelo e, na sequência, a inativação do outro alelo. Perdas alélicas em regiões particulares de cromossomos são comuns e podem indicar deleção do segundo alelo de um gene supressor tumoral. A *LOH* de uma região em particular em um tumor pode incluir genes específicos cuja inativação é essencial para transformação e lhes confere uma vantagem seletiva associada com progressão tumoral (Yang e cols., 2002). Os genes supressores de tumor encontram-se distribuídos por todo o genoma humano, e algumas regiões cromossômicas, como 3p, 9p, 11p, 17p são relatadas na literatura como deletadas em uma série de tumores, incluindo câncer de mama, pulmão, melanoma, carcinoma de cabeça e pescoço e ameloblastomas (Field e cols., 1995; Rowley e cols.,

1996; Migaldi e cols., 2007; Sinha e cols., 2008). Alguns destes estudos têm correlacionado a LOH com um pior prognóstico tumoral (Field e cols., 1995; Bremmer e cols., 2008; Lee e cols., 2010).

As análises da *LOH* em neoplasias são geralmente conduzidas com amostras pareadas de tumor/tecido normal. Uma das formas para detectar a *LOH* é através da utilização de marcadores de microssatélites, próximas a genes supressores de tumor. Os microssatélites são pequenas sequências (“sequence motif”), com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem, altamente polimórficas na população e suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (Migaldi e cols., 2008). Estudos apontam que os microssatélites podem ter um grande potencial para predizer o risco de desenvolvimento dos tumores e que a *LOH* é um dos importantes eventos para a inativação de um gene supressor de tumor levando ao crescimento neoplásico (Van Houten e cols., 2000; Collin-Chavagnac e cols., 2010; Song e cols., 2010). Esta análise identifica regiões de *LOH* examinando alterações no *status* genômico de células normais e de células tumorais do mesmo paciente (Van Houten e cols., 2000).

Diferentes autores observaram altas frequências de *LOH* na região do braço curto do cromossomo 3 (3p). Fu e cols. (2007) mostraram que a região mais afetada pela *LOH* situa-se entre 3p14 e 3p25, sugerindo a presença, neste sítio, de genes envolvidos na carcinogênese do câncer de mama. A associação entre a perda de heterozigosidade na região 3p e a ausência de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona foi demonstrada por Martinez e cols. (2001). Estes autores sugerem que os genes situados nesta região cromossômica têm algum papel na progressão tumoral, estando associados à maior severidade da doença.

Chen e cols. mostraram que a perda de heterozigosidade em tumores primários era semelhante à obtida em linfonodos, sugerindo que este evento ocorre precocemente no desenvolvimento neoplásico.

A *LOH* para o marcador intragênico D3S1300 no gene *FHIT* tem sido relatada em 25 a 59% dos casos de câncer de mama esporádicos (Santos e cols., 2004). Alguns estudos indicam que essa mutação pode estar associada com um pior desfecho clínico e marcadores prognósticos desfavoráveis, como aumento na graduação e no tamanho tumoral (Huebner e cols., 1998; Silva Soares e cols., 2010). Também foram observadas alterações em lesões pré neoplásicas, sugerindo que as deleções no *FHIT* pudessem ser um evento antecipado em uma fração significativa de carcinomas mamários (Ahmadian e cols., 1997).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ahmadian M, Wistuba II, Fong KM, Behrens C, Kodagoda DR, Saboorian MG *et al.* Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Res.* 1997 Sep;57,3664±3668.

Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvale G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer.* 2005 Jan 17;92(1):167-75.

Anderson BO, Calhoun KE, Rosen EL. Evolving concepts in the management of lobular neoplasia. *J Natl Compr Canc Netw.* 2006 May;4(5):511-22. Review.

Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol.* 2003 Nov;25(3):190-202.

Barnes LD, Garrison PN, Sibrashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry.* 1996 Sep 10;35(36):11529-35.

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2140-5.

Beral V; Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2003 Aug 9;362(9382):419-27. Erratum in: *Lancet.* 2003 Oct 4;362(9390):1160.

Bremmer JF, Braakhuis BJ, Brink A, Broeckaert MA, Beliën JA, Meijer GA *et al.* Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. *J Oral Pathol Med.* 2008 Nov;37(10):599-606.

Brown MA. Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv Genet.* 1997;36:45-135. Review.

Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1430-41. Review.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL *et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*. 1983 Oct 27-Nov 2;305(5937):779-84.

Chen LC, Kurisu W, Ljung BM, Goldman ES, Moore D 2nd, Smith HS. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Apr 1;84(7):506-10.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347: 1713-1727

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350: 1047-1059.

Collin-Chavagnac D, Marçais C, Billon S, Descotes F, Piaton E, Decaussin M *et al.* Quantitative loss of heterozygosity analysis for urothelial carcinoma detection and prognosis. *Urology*. 2010 Aug;76(2):515.e1-7.

Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CK, Hicks J, King TA *et al.* Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol Oncol*. 2013 Oct;7(5):859-69

Croce CM, Sozzi G, Huebner K. Role of FHIT in human cancer. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1618-24.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19(5):403-410.

Field JK, Kiaris H, Risk JM, Tsiriyotis C, Adamson R, Zoumpourlis V *et al.* Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer*. 1995 Nov;72(5):1180-8. Erratum in: *Br J Cancer*. 1996 Oct;74(7):1153

Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R *et al.* Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 25;97(9):4742-7.

- Fu Q, Yao GY, Tang XL, Chen LR, Zheng ZX. [Microsatellite instability and allele-specific chromosome 3p deletion in breast cancer and precancerous lesions]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2007 Jan;29(1):34-40. Chinese
- Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, Norris BA. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000 Mar 15;88(6):1378-83.
- Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, McCue P *et al*. Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. *Pathol Int*. 2005 Aug;55(8):471-8.
- Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology. The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res*. 2004;6:213-218.
- Harris, A L. Breast screening remains a controversial issue. *Br. J. Cancer*; 2013 June;108:2197.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1131-8. Review.
- Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet*. 1998;32:7-31. Review
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009 [acesso em 5 out 2011].  
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014 [acesso em 27 de nov 2013]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol*. 2006 May 10;24(14):2137-50.
- Kumar, V; Abbas, A. K; Fausto, N. Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

- Lee DJ, Schönleben F, Banuchi VE, Qiu W, Close LG, Assaad AM *et al.* Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis. *Cancer Biol Ther.* 2010 Oct 1;10(7):689-93.
- Li CI, Malone KE, Daling JR. Differences in breast cancer hormone receptor status and histology by race and ethnicity among women 50 years of age and older. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jul;11(7):601-7.
- Lippman ME, Dickson RB, Gelmann EP, Rosen N, Knabbe C, Bates S *et al.* Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem.* 1987 Sep;35(1):1-16. Review
- MacMahon B. Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int J Cancer.* 2006 May 15;118(10):2373-8. Review.
- Managing Risk. In: *Diseases of the Breast*, 2th ed, edited by Jay R. Harris. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000: 175.
- Martinez A, Walker RA, Shaw JA, Dearing SJ, Maher ER, Latif F. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features, *Mol. Path.* 2001;54(5):300–306.
- Masood S. Prognostic/predictive factors in breast cancer. *Clin Lab Med.* 2005 Dec;25(4):809-25, VIII. Review.
- Menke CH, Biazús JV, Xavier NL, Cavaleiro JA, Rabin EG, Bittelbrunn A, et al. *Rotinas em mastologia.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2007
- Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2008 Jan;44(1):50-60. Epub 2007 Feb 16.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg.* 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J *et al.* The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers. *Cell.* 1996 Feb 23;84(4):587-97.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European journal of cancer (Oxford).* 2001 37: 4-66.

- Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol.* 2002 Dec;3(12):748-54. Review.
- Pérez-Escamilla R, Guerrero ML. Epidemiology of breastfeeding: advances and multidisciplinary applications. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:45-59. Review.
- Rowley H, Jones A, Spandidos D, Field J. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 May;122(5):497-501.
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):131-42.
- Santos SC, Cavalli LR, Cavalli IJ, Lima RS, Haddad BR, Ribeiro EM. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and FHIT genes in patients with sporadic breast cancer from Southern Brazil. *J Clin Pathol.* 2004 Apr; 57:374-377
- Scarf RW, Torloni H. Histological typing of breast tumors. In: *International classification of tumors No 2.* Geneva: World Health Organization, 1968:19-20.
- Silva Soares EW, de Lima Santos SC, Bueno AG, Cavalli IJ, Cavalli LR, Fouto Matias JE *et al.* Concomitant loss of heterozygosity at the BRCA1 and FHIT genes as a prognostic factor in sporadic breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 May;199(1):24-30.
- Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S *et al.* Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2008 Apr;15(4):1070-80.
- Song Z, Li R, You N, Tao K, Dou K. Loss of heterozygosity of the tumor suppressor gene Tg737 in the side population cells of hepatocellular carcinomas is associated with poor prognosis. *Mol Biol Rep.* 2010 Dec;37(8):4091-101.
- Tay LK, Russo J. Formation and removal of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-nucleic acid adducts in rat mammary epithelial cells with different susceptibility to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1981;2(12):1327-33.
- Tiezzi DG. Epidemiologia do Câncer de Mama. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009 May;31(5):213-5.
- Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA *et al.* Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-

neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3803-16. Review

Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet.* 2005 May 14-20;365(9472):1727-41. Review.

Wali A. FHIT: doubts are clear now. *ScientificWorldJournal.* 2010 Jun 16;10:1142-51

Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, et al. Epidemiology and Assessing and  
Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N *et al.*  
Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994 Sep 30;265(5181):2088-90

Yang Q, Yoshimura G, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Chromosome 3p and breast cancer. *J Hum Genet.* 2002;47(9):453-9. Review

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

Avaliar a perda de heterozigidade (LOH) do gene *FHIT*, utilizando o marcador intragênico D3S1300, no tecido neoplásico e no tecido mamário não neoplásico de pacientes com carcinoma de mama.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2.1. Correlacionar os achados referentes à LOH do gene *FHIT* com os fatores de risco para câncer de mama: idade, etnia, menarca precoce e menopausa tardia.
- 2.2.2. Correlacionar os achados referentes à LOH do gene *FHIT* com fatores prognósticos/preditivos para o câncer de mama: tipo histológico do tumor, tamanho e grau tumoral, estadiamento TNM, presença de expressão imunohistoquímica positiva para receptores hormonais (estrogênio e progestogênio) e HER-2.
- 2.2.3. Correlacionar os achados referentes à LOH do gene *FHIT* com o tempo de sobrevida global das pacientes.

### 3. Artigo científico redigido em inglês

#### **Loss of Heterozygosity to the intragenic marker D3S1300 in patients with breast cancer**

##### **Abstract**

Alterations involving the 3p14 region, on the site that contains the *FHIT* gene, have been frequently observed on breast tumors. In this study, we evaluated the Loss of Heterozygosity (LOH) to the intragenic marker D3S1300 on *FHIT* gene in tissue samples of 42 patients with breast cancer and related it with risk factors, prognostic/predictive factors and survival time. Tumoral tissue and mammary non-neoplastic tissue from female patients with breast cancer were analyzed. PCR was used to amplify the D3S1300 marker, followed by capilar electrophoresis on ABI-PRISM 3130 equipment and the analysis was performed by GeneMapper software. LOH was detected on 24.3% (10/41) of the informative samples. There were no significant differences between the results of LOH and breast cancer risk factors. Regarding to estrogen and progesterone receptors (ER and PR) and human epidermal growth factor 2 (HER-2) there were no correlations with LOH in the analysis. When we analyzed LOH results and prognostic factors, we observe that LOH was significantly higher in patients with vascular invasion ( $p=0,049$ ). However, the overall and disease-free survival in 48 months of follow up did not show any significant difference relating to LOH ( $P=0.43$ ;  $P=0.860$ ). In conclusion, the frequency of LOH to *FHIT* gene, observed in our study, is in accordance to the related amplitude verified in another breast cancer studies. The frequency of LOH was significantly related to the presence of vascular invasion, considered a bad prognostic factor to breast cancer.

**Keywords: Breast cancer, LOH, FHIT gene, risk and prognostic factors**

## Introduction

In Brazil, breast cancer is considered the most frequent malignant tumor in women and the one with highest mortality, in the last 20 years<sup>1</sup>.

Nowadays, countless genes have been studied aiming to identify new markers that can be utilized on diagnosis and, mainly, on the follow up of the patients with breast cancer. Thus, the study of potential tumoral markers is an important field of investigation considering that they could be auxiliary tools, not only to the comprehension of the mechanisms of tumoral development, but also, for clinical use.

Structural chromosomal alterations, as loss of chromosomal regions, are events frequently observed in breast cancer<sup>2</sup>. Among those, are the alterations involving the 3p14.2 region, on the site that contains *FHIT* gene. The Loss of Heterozygosity (LOH) to the intragenic marker D3S1300 on *FHIT* gene has been reported on a frequency that varies from 25% to 59% of the breast cancer cases<sup>3</sup>. In this study, we evaluated LOH concerning this gene, in tumor samples from female individuals with breast cancer relating it to risk factors, prognostic and predictive factors, and to survival.

## Material and Methods

### Patients

The study sample was composed by paired tumoral tissue and non-neoplastic mammary tissue samples from 42 female patients diagnosed with breast carcinoma, by anatomopathological exam, treated at Hospital Fêmina (HF) Mastology Service. Patients with proliferative mammary pathologies, such as atypical ductal or lobular hyperplasias, sclerosing adenosis or complex fibroadenoma, those with previous history or actual of other types of cancer and male patients were excluded from the study.

According to the routine of HF, all patients were evaluated on pre-operative period to diagnose and stage the disease. Clinical and pathological data were filled on a protocol, including breast cancer risk factors. Data regarding anatomopathological characteristics and patients' follow up were collected from medical records.

Tumoral stage was established according to the TNM staging system, conforming to the American Joint Committee on Cancer (2003).

Tumoral tissue and non-neoplastic mammary tissue specimens were obtained during surgical procedure to treat the disease and they were frozen at -20° Celsius to be analyzed subsequently.

All the patients on this study signed an Informed Consent Form, approved with the project, by the Committee of Ethics on Research of UFCSPA (Protocol #10-641) and HF (protocol #11-037).

### **DNA extraction**

Genomic DNA was extracted from the tissues, using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) extraction kit, following manufacturer's instructions (Invitrogen Kit Handbook).

### **PCR**

Polymerase chain reaction was used to amplify the microsatellite marker D3S1300, located within FHIT gene (intron 5). Primers were constructed according to the information on the data bank on GenBank® (5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3' / 3'-GCCAATTCCCCAGATG-5').

The initial conditions to the PCR reaction were performed as described by Ingvarsson et al. (2001)<sup>4</sup> with modifications. Reactions were prepared to a final

volume of 25 $\mu$ L, containing 1 $\mu$ L of genomic DNA, PCR buffer 10X, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM of dNTPs, 750nM of each pair of primer and 1,0 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, USA). Each microsatellite was amplified using genomic DNA from tumoral and normal tissues. To amplify the microsatellites, after initial denaturation during 5 minutes at 94°C, 30 to 35 cycles were realized following the stages of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 48-58°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 to 45 seconds, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes.

### **LOH analysis**

The amplified PCR products were analyzed on agarose 1% gel, using ethidium bromide, to verify its specificity and approximate concentration. It was taken 1 $\mu$ L of the amplified reactions to be homogenized with 8.5 $\mu$ L of formamide and 0.5 $\mu$ L of GeneScan 500 LIZ<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Samples were denaturated for 5 minutes at 95°C and subsequently analyzed by capilar electrophoresis on ABI-PRISM 3130 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>, Foster City, CA, USA). The results were analyzed by GeneMapper<sup>TM</sup>, version 4.0 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>, Foster City, CA, USA) and LOH was calculated based on the height value of allele 1 (A1)/height of allele 2 (A2) of normal tissue and tumoral tissue samples, according to Van Houten et al<sup>5</sup>.

A1: A2 (normal)

---

A1:A2 (tumor)

The samples whose reasons between values of normal and tumoral alleles were less or equal to 0.67 or higher or equal to 1.35 were defined as LOH. The cases that presented only one allele on DNA of normal tissue (homozygote) or that the results weren't clear, due to stutter or artifacts, were considered as non-informative (NI). Values between 0.67 and 1.35 were considered heterozygotes.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was made using IBM – Statistical Package for the Social Sciences™, version 19 (IBM Corp. Armonk, NY, USA. Released on 2010). Frequencies of LOH were obtained by direct counting. Chi-Square was used on comparison of histopathological parameters and Fisher's Exact Test was used on clinical and hormonal variables. All the results of P were bi-tailed and the confidence interval was 95%.

Survival overall was determined by Log Rank test and demonstrated through Kaplan Meier's curve and the follow-up time was 48 months.

### **Results**

The studied sample was constituted by 42 patients, with mean age of  $56,4 \pm 12,5$  years. LOH was observed in 24.3% (10/41) of the informative samples. One patient was considered non informative because she was homozygote to FHIT.

Table 1 shows the results of LOH analysis, demographic parameters (race and age) and the studied risk factors (menarche and menopause).

**Table 1. Association between demographic and clinic characteristics and LOH to D3S1300 marker**

<b>Characteristics</b>	<b>Retention of Heterozygosity (ROH)</b>	<b>Loss of Heterozygosity (LOH)</b>	<b>P*</b>
Race			
Caucasian	30 (96.8)	10 (100)	1.000
African American	1 (3.2)	0 (0)	
Age			
≤45	7 (22.6)	2 (20)	1.000
>45	24 (77.4)	8 (80)	
Menopause			
Yes	19 (61.3)	7 (70)	0.720
No	12 (38.7)	3 (30)	
Menopausal Age			
Without menopause	12 (38.7)	3 (30)	0.815
≤45	4 (12.9)	1 (10)	
>45	15 (48.4)	6 (60)	
Menarche			
≤12	5 (16.1)	4 (40)	0.185
>12	26 (83.9)	6 (60)	
<b>* Fisher's exact test</b>			

Table 2 shows the result of LOH analysis relating to hormone receptors expression and HER-2 status. It was not observed any correlation between the evaluated groups (RE P = 0.662; RP P=0.413; HER2 P=0.580).

**Table 2. Association between hormonal variables and Retention or Loss of Heterozygosity**

<b>Characteristics</b>	<b>Retention of Heterozygosity (ROH)</b>	<b>Loss of Heterozygosity (LOH)</b>	<b>P*</b>
Sample Size	31 (75.6)	10 (24.3)	
ER Status			
Positive	25 (80.6)	7 (70)	0.662
Negative	6 (19.4)	3 (30)	
PR Status			
Positive	24 (77.4)	6 (60)	0.413
Negative	7 (22.6)	4 (40)	
HER 2			
Positive	3 (9.7)	2 (20)	0.580
Negative	28 (90.3)	8 (80)	
<b>* Fisher's exact test</b>			

Table 3 shows the patient's distribution accordingly to TNM Stage Classification (TNM Classification of Malignant Tumors – 10<sup>th</sup> ed. 2010/UICC), histological grade and peritumoral vascular invasion and LOH results. We observed that 77.8% of the patients with LOH in FHIT presented vascular invasion (P=0.049).

**Table 3. Association between clinic pathological variables and Retention or Loss of Heterozygosity**

Characteristics	Retention of Heterozygosity (ROH)	Loss of Heterozygosity (LOH)	P
Sample Size	31 (75.6)	10 (24.3)	
Peritumoral Vascular Invasion*			
Sample Size**	n =23	n = 9	0.049***
Present	8 (34.8)	7 (77,8)	
Absent	15 (65.2)	2 (22,2)	
TNM Stage Classification			0.150
1	8 (25.8)	1 (10)	
2	11 (35.5)	2 (20)	
3	12 (38.7)	6 (60)	
4	0 (0)	1 (10)	
Histological grade			0.575
1	3 (9.7)	0 (0)	
2	18 (58)	6 (60)	
3	10 (32.3)	4 (40)	

\* Fisher's Exact Test  
 \*\* Reduced Sample Size (n=32), omitting cases with unknowns  
 \*\*\* Statistically significant difference

**Fig. 1. Kaplan-Meier function survival in 39 breast cancer patients in terms of LOH and ROH at FHIT locus.**



Relapse and overall survival were calculated after a 48 months follow-up period, from a sample size of 39 patients (we lost follow-up on two). Retention of heterozygosity was present on 29 patients and 5 of them had relapsed. The other 10 patients presented LOH and obtained 90% of disease-free survival. There was no statistical difference between the patients survival and LOH ( $P=0.860$ ) (Figure 1).

## Discussion

Breast cancer is a genetically heterogeneous disease. The investigation of genes that play a role in mammary carcinogenesis is crucial, as the identification of molecular markers capable of help on early diagnosis and on the patient's therapeutic follow up<sup>6</sup>.

Among genetic alterations, LOH involving the short arm of the chromosome 3 (3p) is one of the most observed events on a variety of tumors<sup>7</sup>.

Chromosomal loss involving the sub-region 3p14.2, where is located the FHIT gene, leading to reduced or absence of its product, has been described on studies about breast cancer, suggesting that this gene has a relevant role in this neoplasia physiopathology<sup>8</sup>.

In our study, the LOH frequency involving the FHIT gene, detected by the intragenic marker D3S1300, on the informative patient's samples, was of 24.3%. Even though our result is within the described values by other studies (24 a 59%), we can considerate that these huge variation observed in the LOH frequency by different researches deserves better evaluation<sup>9,10,11</sup>.

When we compare the LOH frequency in relation to well established risk factors to this neoplasia (age, late menopause and early menarche) there was no significantly differences among the samples.

Likewise, excluding peritumoral vascular invasion (table 3), other prognostic/predictive factors, such as stage, tumor grade and ER and PR status and

HER2 didn't show any differences between Retention of Heterozygosity (ROH) and LOH patients samples.

Some researches demonstrate results that agreed with the ones observed in our study. Campiglio et al. (1999) didn't find any association between RNAm levels or the concentration of FHIT gene product and tumoral grade, absence of hormonal receptors and high expression of HER2<sup>12</sup>.

Gatalica et al. (2000) didn't observed statistically significant association between FHIT gene product expression and age, family history, stage, histological grade and tumoral size<sup>13</sup>. Similarly, Santos et al. (2004) couldn't find the relation among LOH frequency in this locus and histopathological parameters (tumoral size, histological grade and presence or absence of metastatic lymph node) on the investigated patients<sup>14</sup>.

Arun et al. (2005) verified that FHIT gene loss of expression correlated with poor prognosis markers on patients without lymph node metastasis, just as high p53 and Ki-67 expression and low bcl-2 expression. However, the same research did not demonstrate significantly statistical association between FHIT expression and age, tumor size and estrogen receptor status or COX-2<sup>15</sup>.

By the other hand, Ingvarsson et al. (2001) observed that LOH involving FHIT gene correlated with ER and PR status and with a survival reduction, investigating the samples of 239 patients<sup>16</sup>. Yang et al (2001) showed that the reduced expression of FHIT gene was significantly associated with histological grade, absence of ER and low survival rates. This study was performed with more than a hundred Asian female patients<sup>17</sup>.

The observed discrepancy among those published studies<sup>12-17</sup> may have different causes, for example, methodological variants: specific LOH markers analysis, decrease

of genic expression by evaluation of genic product concentration, or transcript reduction or absence. We could, yet, cite the sample size of each study.

In our study the only parameter that presented significant difference between samples was the presence of peritumoral vascular invasion ( $p=0,049$ ). Vascular invasion is the most important pathological prognostic factor to regional lymph node disease. According to Colleoni et al., patients with vascular invasion presents, beyond unfavorable prognostic factors, higher chances of developing distance metastasis and lower overall survival<sup>18</sup>.

In our study, the frequency of LOH on FHIT gene verified is according to data observed in other researches. In a different manner, it showed statistical significance in only one poor prognosis histological parameter, the vascular invasion. This fact can be due to the reduced sample size or the several methodological analyses amidst other studies about this topic. We believe that, in the future, stouter studies should be lead, trying to elucidate the role and relevance of FHIT gene on breast carcinogenesis.

### **Acknowledgements**

This work was supported in part by National Research Council for Scientific and Technologic Development (CNPq), Brazil.

## References

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014 [access on November 27th 2013]. On <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>
2. Miyakis, S, Spandidos DA. Allelic loss in breast cancer. *Cancer detection and prevention*. New York. 2002;26(6):426-434.
3. Chen LC, Kurisu W, Ljung BM, Goldman ES, Moore D 2nd, Smith HS. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Apr 1;84(7):506-10.
4. Ingvarsson S. FHIT alterations in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2001 Oct;11(5):361-6. Review.
5. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, *et al*. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res*. 2000 Oct;6(10):3803-16. Review
6. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360(8):752–800.
7. Zabbarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*. Basingstoke. 2002;21:6915-6935.
8. Huebner K, Croce CM. Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Brit. J. Cancer*. 2003;88:1501-1505.
9. Santos SC, Cavalli LR, Cavalli IJ, Lima RS, Haddad BR, Ribeiro EM. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and FHIT genes in patients with sporadic breast cancer from Southern Brazil. *J Clin Pathol*. 2004 Apr; 57:374-377.
10. Maitra A, Wistuba II, Washington C, Virmani AK, Ashfaq R, Milchgrub S, *et al*. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and

- precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am. J. Path.* 2001;159:119-30.
11. Ahmadian M, Wistuba II, Fong KM, Behrens C, Kodagoda DR, Saboorian MG *et al.* Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Res.* 1997 Sep;57:3664±3668.
  12. Campiglio M, Yuri Pekarsky, Sylvie Menard, Elda Tagliabue, Silvana Pilotti, and Carlo M. Croce<sup>2</sup> *FHIT* Loss of Function in Human Primary Breast Cancer Correlates with Advanced Stage of the Disease. *Cancer Res.* 1999;59:3866-3869.
  13. Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, Norris BA. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2000 Mar 15;88(6):1378-83.
  14. Santos SC, Cavalli LR, Cavalli IJ, Lima RS, Haddad BR, Ribeiro EM. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and FHIT genes in patients with sporadic breast cancer from Southern Brazil. *J Clin Pathol.* 2004 Apr; 57:374-377.
  15. Arun B, Kilic G, Yen C, Foster B, Yardley D, Gaynor R, *et al.* Loss of FHIT Expression in Breast Cancer Is Correlated with Poor Prognostic Markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2005 July;14:1681.
  16. Ingvarsson S, Sigbjornsdottir BI, Huiping C, Jonasson JG, Agnarsson BA. Alterations of the FHIT gene in breast cancer: association with tumour progression and patient survival. *Cancer Detect.* 2001;25:318–324.
  17. Yang Q, Yoshimura G, Suzuma T, Tamaki T, Umemura T, Nakamura M, *et al.* Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription and protein expression in breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7: 3869– 3873.
  18. Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Sonzogni A, Pruneri G, Casadio C, *et al.* Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Ann Oncol.* 2007 Oct;18(10):1632-40.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, o câncer da mama é a neoplasia de maior mortalidade na população feminina. Mesmo após décadas de estudos, as previsões apontam que o câncer de mama continuará sendo uma das mais importantes causas de morte nas próximas décadas. Recentes avanços no campo da biologia molecular permitiram um melhor entendimento da gênese desta neoplasia. Desta forma, o estudo de potenciais marcadores moleculares é um importante campo de investigação considerando que, os mesmos, podem ser ferramentas úteis tanto na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e progressão destes tumores como no manejo clínico dos pacientes, auxiliando nos processos de diagnóstico, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico.

Concluimos que os resultados de nosso estudo, em geral, estão de acordo com dados observados em outros trabalhos. Por outro lado, em relação a associação observada entre LOH para o marcador intragênico D3S1300 e o fator prognóstico invasão vascular, destacamos a necessidade de investigação mais abrangente, utilizando outras abordagens metodológicas e maior tamanho amostral.

## 5. ANEXOS

### ANEXO A - TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES DE MAMA – OMS 2012

#### Tumores Epiteliais

Carcinoma ductal invasivo, sem tipo especial 8500/3  
 Carcinoma tipo misto  
 Carcinoma pleomórfico  
 Carcinoma com osteoclastos gigantes 8035/3  
 Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos  
 Carcinoma with elementos melanóticos  
 Carcinoma lobular invasivo 8520/3  
 Carcinoma tubular 8211/3  
 Carcinoma cribriforme invasivo 8201/3  
 Carcinoma medular 8510/3  
 Carcinoma mucinoso e outros tumores com mucino abundante  
 Carcinoma mucinoso 8480/3  
 Carcinoma mucinoso e cistadenocarcinoma com células colunares 8480/3

Tumores neuroendócrinos  
 Carcinoma neuroendócrino sólido  
 Tumores carcinóides atípicos 8249/3  
 Carcinoma de células pequenas 8041/3  
 Carcinoma neuroendócrino de células grandes 8013/3  
 Carcinoma papilar invasivo 8503/3  
 Carcinoma micropapilar invasivo 8507/3  
 Carcinoma apócrino 8401/3  
 Carcinomas metaplásicos 8575/3  
 Carcinoma metaplásico epitelial puro 8575/3  
 Carcinoma de células escamosas 8070/3  
 Adenocarcinoma com metaplasia de células fusiformes 8572/3  
 Carcinoma adenoescamoso 8560/3  
 Carcinoma mucoepidermoide 8430/3  
 Carcinoma metaplásico misto epiteliais/mesenquimais 8575/3

Carcinoma rico em lipídeos 8314/3  
 Carcinoma secretor 8502/3  
 Carcinoma oncocítico 8290/3  
 Carcinoma adenóide cístico 8200/3  
 Carcinoma das células acinares 8550/3  
 Carcinoma das células claras rico em glicogênio 8315/3  
 Carcinoma sebáceo 8410/3  
 Carcinoma inflamatório 8530/3

Neoplasia Lobular  
 Carcinoma lobular in situ 8520/2

Lesões intraductais proliferativas  
 Hiperplasia ductal usual  
 Atipia do epitélio chato  
 Hiperplasia ductal atípica  
 Carcinoma ductal in situ 8500/2

Carcinoma microinvasivo

Neoplasmas papilares intraductais  
 Papiloma central 8503/0  
 Papiloma periférico 8503/0  
 Papiloma atípico  
 Carcinoma papilar intraductal 8503/2  
 Carcinoma papilar intracístico 8504/2

Proliferações epiteliais benignas  
 Adenose incluindo variantes  
 Adenose esclerosante  
 Adenose apócrina

Mudança das células colunares  
 Adenose microglandular  
 Adenose adenomioepitelial  
 Cicatriz radial / lesão esclerosante complexa

Adenomas  
 Adenoma tubular 8211/0  
 Adenoma lactante 8204/0  
 Adenoma apócrino 8401/0  
 Adenoma pleomórfico 8940/0  
 Adenoma ductal 8503/0

#### Lesões mioepiteliais

Mioepiteliase  
 Adenose adenomioepitelial  
 Adenomioepitelioma 8983/0  
 Mioepitelioma maligno 8982/3

**Tumores mesenquimais**  
 Hemangioma 9120/0  
 Angiomatose  
 Hemangiopericitoma 9150/1  
 Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa  
 Miofibroblastoma 8825/0  
 Fibromatose (agressiva) 8821/1  
 Tumor miofibroblástico inflamatório 8825/1

Lipoma 8850/0  
 Angiolipoma 8861/0  
 Tumor das células granulares 9580/0  
 Neurofibroma 9540/0  
 Schwannoma 9560/0  
 Angiosarcoma 9120/3  
 Liposarcoma 8850/3  
 Rabdomyosarcoma 8900/3  
 Osteosarcoma 9180/3  
 Leiomioma 8890/0  
 Leiomiosarcoma 8890/3

**Tumores fibroepiteliais**  
 Fibroadenoma 9010/0  
 Tumors filodes 9020/1  
 Benigno 9020/0  
 Boarderline 9020/1  
 Maligno 9020/3

Sarcoma estromal periductal, baixo grau 9020/3

Hamartoma mamário

#### Tumores do mamilo

Adenoma de mamilo 8506/0  
 Adenoma siringomatoso 8407/0  
 Doença de Paget do mamilo 8540/3

#### Linfoma maligno

Linfoma das células B grandes difusas 9680/3  
 Linfoma de Burkitt 9687/3  
 Linfoma extranodal de células B tipo MALT 9699/3  
 Linfoma folicular 9690/3

#### Tumores metastáticos

#### Tumores da mama masculina

Ginecomastia  
 Carcinoma  
 Invasivo 8500/3  
 In situ 8500/2

## ANEXO B – GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

Sistema de Graduação Histológica de Nottingham (Modificação de Nottingham do sistema de Bloom-Richardson)

Formação tubular:

- escore = 1, a maior parte do tumor forma túbulos (> 75%);
- escore = 2, a formação de túbulos é moderada (10% a 75%);
- escore = 3, a formação de túbulos é pouca ou nenhuma (< 10%).

Pleomorfismo nuclear:

- escore = 1, os núcleos são regularmente uniformes, com mínima variação (discreto);
- escore = 2, moderada variação no tamanho e formato nuclear (moderado);
- escore = 3, marcada variação na forma e no tamanho nuclear (acentuado).

Atividade mitótica

É avaliada em dez campos de grande aumento (cga), conforme tabela padrão, dependente do tamanho do campo do microscópio utilizado:

- escore = 1, até sete figuras de mitoses em 10cga (pouca);
- escore = 2, de oito a 15 figuras de mitoses em 10cga (moderada);
- escore = 3, mais que 15 figuras de mitoses em 10cga (acentuada).

A soma dos escores obtidos em cada um destes itens gera um escore final que varia de 3 a 9, correspondendo aos seguintes graus de diferenciação histológica:

- grau I (baixo) – bem diferenciado –3 a 5;

81

- grau II (intermediário) – moderadamente diferenciado –6 a 7;
- grau III (alto) – pouco diferenciado –8 a 9.

**ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFCSPA****COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
UFCSPA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

**Projeto:** 10-641**Versão do Projeto:****Versão do TCLE:****Pesquisadores:**

ADRIANA ROEHE

GRASIELA AGNES

CARMELA NICOLINI

BRUNA PEIXOTO DE SOUZA

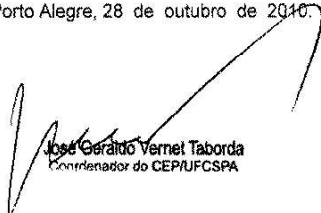
TALITA HAUBERT CERÚTTI

CLÁUDIO OSMAR PEREIRA ALEXANDRE



**Título:** CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO.

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP".

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.

  
José Geraldo Vernet Taborda  
Coordenador do CEP/UFCSPA

## ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO

	<b>HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.</b> Av. Francisco Traveno, 2348 CEP 91350-200 - Porto Alegre - RS Fone: 3337-2000 CNPJ: 02.787.118/0001-20	<b>HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO</b> (Unidade Pediátrica do Hospital Nossa Senhora da Conceição S.A.) CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS Fone: 3337-4100 CNPJ: 02.787.126/0001-76	<b>HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.</b> Rua Domingos Rabin, 20 CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS Fone: 3337-4100 CNPJ: 02.787.126/0001-76	<b>HOSPITAL FEMINA S.A.</b> Rua Maracano, 17 CEP 91420-001 - Porto Alegre - RS Fone: 3314-5200 CNPJ: 02.693.134/0001-53	
Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto n 99.244/90					
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC					
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em reunião extraordinária realizada em 27 de abril de 2011, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:</p>					
<b>Projeto:</b> 11-037		<b>Versão do Projeto:</b>		<b>Versão do TCLE:</b>	
<p><b>Pesquisadores:</b>          ADRIANA VIAL ROEHE          GRASIELA AGNES          DANIELE L. DOS REIS SCHNEIDER          ANDRÉA PIRES SOUTO DAMIN</p>					
<p><b>Título:</b> Câncer de mama: Estudo epidemiológico, de características clnicopatolgicas e moleculares e fatores de risco.</p>					
<p>Documentação: Aprovados          Aspectos Metodológicos: Aprovados          Aspectos ticos: Aprovados</p>					
<p>Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.</p>					
<p>Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.</p>					
 Daniel Demétrio Faustino da Silva Coordenador-geral do CEP/GHC				Porto Alegre, 27 de abril de 2011.	