



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIEGO DE ARAGÃO BEZERRA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO (SNPS) DO GENE ABCB1 C3435T, COM A
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE, EM MULHERES COM
CÂNCER DE MAMA.**

SOBRAL – CE

2018

DIEGO DE ARAGÃO BEZERRA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO (SNPS) DO GENE ABCB1
C3435T, COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE, EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças crônicas

Orientador: Prof. Dr. José Juvenal Linhares

SOBRAL-CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B469a Bezerra, Diego de Aragão Bezerra.
Asociação do polimorfismo (SNPS) do gene ABCB1 C3435T, com a resposta à quimioterapia neoadjuvante, em mulheres com câncer de mama / Diego de Aragão Bezerra Bezerra. – 2018.
43 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2018.
Orientação: Prof. Me. José Juvenal Linhares.
1. Câncer de mama.. 2. Neoadjuvância.. 3. Polimorfismos. 4. Gene ABCB1. I. Título.

CDD 610

AGRADECIMENTOS

Em primazia, a **DEUS**, por ter me conduzido até aqui. Por ter colocado durante minha jornada de aprendizado pessoas de coração bom e honesto. Por guiar meus passos iluminando meu caminho. Fazendo assim acreditar que vale a pena se esforçar.

Aos meus pais, **Maria de Lourdes Marques Aragão Bezerra e José de Alencar Bezerra**, pelos ensinamentos e princípios durante a minha formação pessoal e acadêmica. E por me mostrarem que coragem e a determinação são grandes heranças, e com o tempo colheremos os frutos delas. Apesar de não estarem sempre presentes fisicamente, foram essenciais nesse processo.

Aos meus irmãos, **Dhaiennae Eloilson**, pelas palavras de coragem e admiração, mesmo de longe me incentivando.

A minha amada esposa **Tárcilla Pinto**, pelo incentivo e apoio desde o princípio desse desafio. Obrigado pelo companheirismo e palavras de conforto diárias, que me faziam acreditar que tudo daria certo.

Aos queridos filhos **Yuri, Sofia e Miguel** (*in utero*) que de forma indireta me incentivam a buscar sempre o melhor. Vocês são minha base!

Ao meu orientador **Dr Juvenal Linhares**, pelos momentos de ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela compreensão, incentivo e paciência. Acreditando assim, na minha capacidade para realização desse trabalho. Muito Obrigado Professor!

Aos amigos, **Vinicius e Lucas Sabóia**, pelo estímulo e ajuda desde o começo. Vocês foram peças fundamentais durante o processo de realização desse trabalho.

Ao amigo, **Paulo Goberlânio da Silva Barros**, pela paciência e ajuda desde o começo.

As minhas colegas de trabalho, **Dr^a Larissa Amadei e Rachel Lima** por compartilharem minhas dores, me acompanharem por toda a progressão e festejarem ao meu lado. Sempre muito pacientes com minhas pendências.

Aos colegas da turma do mestrado, pelas vitórias e ansiedades compartilhadas ao longo do percurso.

A **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**, pela oportunidade de formação humana e profissional concedida.

RESUMO

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais prevalente em mulheres no Brasil, sendo responsável por grande número de mortes relacionadas as neoplasias malignas. Existem várias alternativas usadas no tratamento do câncer de mama, podendo ser empregado tratamento cirúrgico, radioterapia e tratamento sistêmico, pela quimioterapia citotóxica, terapia hormonal e terapia biológica. Quando indicado tratamento sistêmico neoadjuvante, a resposta à quimioterapia empregada é importante para o sucesso da terapia. Alguns fatores podem modificar essa resposta, tais como fatores ambientais, genéticos e resposta às medicações. O gene MDR (ABCB1) codifica a glicoproteína P, uma transportadora de membrana, responsável pelo efluxo celular de uma variedade de drogas, xenobióticos, metabólitos celulares e agentes anticancerígenos, estruturalmente independentes. Os polimorfismos genéticos nesse sítio podem modificar a absorção, acumulação no tecido e eliminação de drogas do organismo. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo (SNPs) do gene ABCB1 C3435T com a resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com câncer de mama na região Norte do estado do Ceará. Foi realizado estudo com 32 pacientes do sexo feminino, que usaram os quimioterápicos de forma neoadjuvante. A genotipagem dos polimorfismos foi feita por reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real alelo específica. A análise estatística foi realizada por meio do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson, utilizando o *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) vs20.0. Os genótipos encontrados para os polimorfismo C3435T estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e suas distribuições genotípicas foram respectivamente CC= 10 (31,1%), CT= 14 (43,8%), TT= 08 (25,0%) sendo, χ^2 : 0,86 e P-value > 0,05. As frequências alélicas foram de C= 0,54 e T= 0,46. Não ocorreram diferenças estatísticas entre os genótipos considerando a resposta a quimioterapia neoadjuvante e a imunohistoquímica, sendo a presença do alelo T associada a pior resposta do status axilar à quimioterapia neoadjuvante. Dessa forma, não foi possível correlacionar a presença do polimorfismo C3435T com a resposta a quimioterapia neoadjuvante, sendo necessária a realização de novos estudos no Brasil envolvendo casuísticas maiores para a validação dos resultados.

Palavras- chaves: Câncer de mama. Neoadjuvância. Polimorfismos. Gene ABCB1.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most prevalent malignant neoplasm in women in Brazil, accounting for a large number of malignant neoplasm-related deaths. There are several alternatives used in the breast cancer treatment, being able to be used surgical treatment, radiotherapy and systemic treatment, by cytotoxic chemotherapy, hormonal therapy and biological therapy. When neoadjuvant systemic therapy is indicated, the response to chemotherapy is important for the therapy's success. Some factors can modify this response, such as environmental, genetic and response factors. The MDR gene (ABCB1) encoding the P-glycoprotein, a membrane carrier, responsible for the cellular efflux of a drugs' variety, xenobiotics, cellular metabolites and anticancer agents, structurally independent. Genetic polymorphisms at this site can modify the absorption, accumulation in the tissue and elimination of drugs from the body. Thus, the objective of this study was to evaluate the association between the polymorphism (SNPs) of the ABC34 C3435T gene and the response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer in the northern region of Ceará state. A study was conducted with 32 female patients, who used chemotherapy in a neoadjuvant way. The polymorphisms genotyping was done by polymerase chain reaction (PCR) in real-time allele-specific. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test or Pearson's Chi-square, using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software vs20.0. The genotypes found for C3435T polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium and their genotypic distributions were respectively CC = 10 (31.1%), CT = 14 (43.8%), TT = 08 (25.0%) being, χ^2 : 0.86 and P-value > 0.05. The allele frequencies were C = 0.54 and T = 0.46. There were no statistical differences between the genotypes considering the response to neoadjuvant chemotherapy and immunohistochemistry, with the presence of the T allele associated with the worst axillary status response to neoadjuvant chemotherapy. Thus, it was not possible to correlate the C3435T polymorphism presence with the response to neoadjuvant chemotherapy, and it is necessary to carry out new studies in Brazil involving larger cases for the results validation .

Keywords: Breast neoplasms, Neoadjuvant chemotherapy, polymorphism, ABCB1 gene.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	100
2. REVISÃO LITERARIA	11
2.1 Aspectos gerais do câncer	111
2.2. Câncer de mama	12
2.3. Polimorfismos genéticos	17
2.4. Polimorfismo gene ABCB1	19
3. JUSTIFICATIVA	21
4.OBJETIVOS	21
5. METODOLOGIA	21
5.1. Desenho (Tipo de Estudo)	21
5.2 Casuística	20
5.3 Critérios de Inclusão/Exclusão	21
5.4 Coleta de dados	21
5.5. Materiais e métodos	22
5.5.1 Análise estatística	22
5.6. Ensaio laboratorial	22
5.6.1. Extração do DNA	22
5.6.2. Realização do PCR	22
5.7. Aspectos éticos da pesquisa	24
6. RESULTADOS	24
6.1 Características gerais	24
6.2. Relação dos genótipos do polimorfismo C3435T	27
7. DISCUSSÃO	29
7.1. Características gerais	29
7.2. Polimorfismos e tratamento	30
8. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da glicoproteína p	16
Figura 2. Localização dos polimorfismos do gene MDR1 na glicoproteína p.....	17
Figura 3. Padrão heterozigoto (CT) – Amplification plots.....	23
Figura 4 - Padrão homozigoto (CC)– Amplification plots.....	23
Figura 5. Padrão homozigoto (TT) – Amplification plots.....	24

Tabelas

Tabela 1. Dados epidemiológicos/ Dados referentes ao tumor.....	25
Tabela 2. Genótipo C/T + C/C e TT.....	27
Tabela 3. Genótipo C/T + TT e CC.....	28
Tabela 4. Genótipo TT e CC.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCBI: ATP-binding cassette sub-sub family B (MDR/TAP) member 1

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

BRCA1: Breast Cancer Gene 1 (Gene do Câncer de Mama 1)

BRCA2: Breast Cancer Gene 2 (Gene do Câncer de Mama 2)

CEM: Centro de Especialidades Médicas

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EGFR: Receptor Fator de crescimento epidérmico

ER: Receptor de estrógeno

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: Kilodalton

MDR1: Multidrug Resistance 1 gene (Gene de Resistência a Multidrogas)

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

***p53*(gene)**: Tumor Suppressor *p53* (Supressor Tumoral *p53*)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RE: Receptor de estrógeno

RECIST: *Response evaluation in solid tumours* (Avaliação de resposta em tumores sólidos)

RNA :ácido ribonucleico

RP: Receptor de progesterona

SNP : Polimorfismos de nucleotídeo único

1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma desordem genética ocasionada pelas alterações nas células normais, podem ser originados pelo o desequilíbrio entre as taxas de crescimento e morte celular. (HANAHAN D, WEINVERG RA, 2000)

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres no Brasil e no mundo. Com exceção dos tumores de pele não-melanomas, esse tipo de neoplasia ocupa a primeira posição em todas as regiões do Brasil, exceto na região Norte(INCA,2018).

A cada ano, cerca de 20% a 29% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. São esperados para o Brasil em 2018, 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

O tratamento para essa neoplasia, quimioterapia neoadjuvante utilizada com a finalidade de reduzir o volume tumoral e levar a uma cirurgia futura menos agressiva, visando a regressão da doença com a finalidade de uma cirurgia mais conservadora e a maiores taxas de cura e sobrevida.

A expressão genética tumoral tem grande repercussão na variação prognostica e preditora de sobrevida nos pacientes de câncer de mama. O Estudo dos polimorfismos, tem sido implicado em respostas variadas a diversos fatores, entre eles, fármacos, resposta inflamatória e imune. A presença do Polimorfismo no Gene ABCB1 implica na resistência a várias drogas, tais como os quimioterápicos.

O presente trabalho, objetiva avaliar a relação entre o Polimorfismo ABCB1 e a resposta a quimioterapia neoadjuvante em mulheres com cancer de mama, visamos esclarecer o papel dessa variação genética, no prognostico e sobrevida dessas pacientes, com grande implicação clinica das pacientes residentes da região norte do Estado do Ceará.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é definido como uma doença genômica e surge a partir de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais que sofrem transformações até se tornarem malignas. Todos os processos desde a iniciação tumoral, transformação, invasão até metástase ocorrem em múltiplas etapas e podem envolver dezenas até centenas de genes, por meio de mutações intragênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos (como metilação e acetilação) (SILVA RL, 2005). Em tecidos normais, as taxas de crescimento e de morte celular estão em equilíbrio. No câncer, esse equilíbrio é rompido por perda no controle do crescimento celular e/ou mecanismos de apoptose (também chamada de morte celular programada). As causas que contribuem para o desenvolvimento do câncer são multifatoriais, envolvendo fatores ambientais (tabagismo, radiação ionizante, álcool, administração de hormônios etc.), fatores endógenos (envelhecimento, obesidade, alterações hormonais, entre outros) e herança genética, em proporções variadas (HANAHAN D, WEINBERG RA, 2000).

Geneticamente, classifica-se o padrão de apresentação dos casos de câncer em três grupos:

- Câncer esporádico: corresponde a 70% dos casos de cânceres e apresenta-se como casos isolados em uma família, geralmente ocorrendo em idade mais avançada. A principal causa são fatores ambientais e endógenos (ROCHA JCC, VARGAS FR, 2001).
- Câncer familiar (ou agregação familiar de câncer): corresponde a 20% dos casos de cânceres, apresentando maior frequência de casos numa mesma família, porém sem padrão de herança medeliano. Além de fatores ambientais e endógenos, os fatores genéticos também contribuem para o aumento de risco ao desenvolvimento de tumores malignos. Geralmente, as alterações genéticas encontradas nesse grupo são polimorfismos (ou variações genéticas comuns na população), chamados de “genes modificadores de risco”, por exemplo, em genes envolvidos nos processos de metabolismo e degradação de produtos tóxicos às células (ROCHA JCC, VARGAS FR, 2001).
- Câncer hereditário: responde por cerca de 5% a 10% dos casos de cancer cuja causa principal é a mutação germinativa (presente em todas as células do corpo) em um gene de alta penetrância (ROCHA JCC, VARGAS FR, 2001)

A formação do câncer é um processo longo, unidirecional e sequencial. É um jogo de forças entre genes e proteínas com ação supressora versus outros genes e proteínas de atuação

contrária. Farber *et al.* (1980) com base em modelos animais, propuseram a divisão de carcinogênese em três etapas: iniciação, promoção e progressão. Esta divisão é racional e didática, mas os compartimentos não são estáticos, ou seja, existem interseção e simultaneidade nas etapas de carcinogênese.

- **Iniciação:** caracterizada por mutações em uma célula tronco provocada por agentes químicos, físicos (radiação ultravioleta e ionizante), biológicos (virus) e herdadas (hereditariedade), geralmente irreparáveis e permanentes, afetando a proliferação celular e morte programada (apoptose). O processo se inicia com a inativação de genes supressores de tumor ou com a ativação de protooncogenes em oncogenes (ROCHA JCC, VARGAS FR, 2001).

Promoção: nessa fase ocorre a expansão de clones mutantes composta de células fenotipicamente alteradas por estímulos à proliferação celular de fatores de crescimento autócrinos onde a célula em transformação secreta seu próprio fator de crescimento (EGF,IGF,VEGF,PDGF,TGF-alfa, HIF, entre outros) ou recruta células inflamatórias e estromais para produzirem esses fatores. A célula desenvolve mecanismos de evasão ao sistema immune, não somente neutralizando linfócitos e macrófagos, mas também os recrutando como verdadeiros aliados (HANAHAN D, WEINBERG RA, 2011).

Progressão: o processo de transformação atinge seu climax, com células mutantes imortais, capazes de proliferar indefinidamente, destruir a lâmina própria e invadir tecidos, linfáticos e ganhar a corrente sanguínea. Genes ligados ao metabolismo da glicose, angiogênese e moléculas de adesão são reprogramados para que a célula consiga sobreviver em situações inóspitas de acidose e hipóxia extrema. Fenotipicamente constituem carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos(HANAHAN D, WEINBERG RA, 2011).

Desta forma o estudo da influência da expressão gênica na tumorigênese pode contribuir no entendimento da biologia do câncer, despertando grande interesse dos pesquisadores nos últimos anos, sendo importantes na avaliação prognóstica e preditiva.

2.2. Câncer de Mama

O câncer de mama é classificado mundialmente como o segundo tipo de câncer de maior prevalência, sendo o mais comum entre as mulheres(PAYANDEH ET AL., 2015). Atualmente é um problema de saúde pública devido à elevada incidência e mortalidade. Para o Brasil, em 2018, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões

Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (22,26/100 mil). O câncer de mama é o tipo que possui a maior incidência e a maior mortalidade na população feminina em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos(INCA,2018).

Durante ano de 2012, ocorreram aproximadamente 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia em todo o mundo, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. As mais altas taxas de incidência encontram-se na Europa Ocidental e as menores taxas na Ásia Oriental. Aproximadamente 43% dos novos casos estimados ocorreram na Europa e na América do Norte. Foram estimados, em 2012, 500 mil óbitos por câncer de mama em mulheres em todo mundo. Essas mortes correspondem a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres, sendo que 34% também incidem em países desenvolvidos na Europa e América do Norte(INCA,2018).

Em geral, as taxas de mortalidade são mais elevadas em regiões mais desenvolvidas socioeconomicamente. Entretanto, configura como a principal causa de morte (324 mil óbitos) nas regiões menos favorecidas e ocupa agora a segunda posição (198 mil óbitos) nas regiões mais desenvolvidas ficando atrás apenas do câncer de pulmão(INCA,2016).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea com relação à clínica e à morfologia. É um tipo de câncer considerado multifatorial, envolvendo fatores biológico, endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida. Envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) são os mais bem conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Além desses, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo e exposição à radiação ionizante também são considerados agentes potenciais para o desenvolvimento desse câncer. A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos. Após essa idade, o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (INCA, 2016).

Entretanto, o câncer de mama observado em mulheres jovens apresenta características clínicas e epidemiológicas bem diferentes das observadas em mulheres mais velhas. Geralmente são mais agressivos, apresentam uma alta taxa de presença da mutação dos genes BRCA1 e BRCA2, além de superexpressarem o gene do fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER2).

A hiperexpressão de alguns oncogenes é presente de forma importante na carcinogênese mamária. São comuns no câncer de mama ganhos nos braços do cromossomo 1q, 8q, 16p e 17q (STEPHENS P, 2005). O gene amplificado da ciclina D1, é relatado em 13 a 21% dos tumores de mama. A expressão do Gene Ciclina D1 é verificada nas fases iniciais da carcinogênese mamária, principalmente em tumores ER (receptores de estrógenos) positivos. Outro gene de elevada importância é o HER-2, do grupo dos receptores da família EGFR, localizado no gene 17q, amplificado em torno de 20-25% dos casos de câncer de mama (STEPHENS P, 2005).

Os genes supressores tumorais, são aqueles que limitam ou suprimem a replicação celular, sendo comum sua perda de função na carcinogênese mamária nos casos de heterozigose dos genes BRCA 1, BRCA 2 e p53 (MILLER LD, 2005).

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA complementar, com a análise paralela de milhares de genes, têm permitido correlacionar perfis de expressão gênica dos cânceres de mama com a evolução clínica das pacientes e com as respostas às terapias utilizadas (RAKHA EA, 2008). Posteriormente, com a necessidade de métodos menos complexos e mais adaptados à rotina clínico-laboratorial, utiliza-se o estudo imunoistoquímico para correlacionar estes subtipos com fatores prognósticos e preditivos (SPITALE A, 2009).

Esta classificação dos subtipos baseada inicialmente na expressão do receptor de estrógeno (RE), no receptor de progesterona (RP) e na proteína HER2 caracterizou o subtipo luminal A, como aqueles que são RE +/RP +/HER2-; o luminal B como RE +/RP+/HER2 +; o subtipo HER2 + como RE -/RP-/HER2 + e o triplo-negativo com todos os três marcadores negativos (DE BROT, M. et al. 2009). Com a adição da análise da expressão da CK 5/6 e do EGFR estes tumores triplo-negativos foram designados como do subtipo basal-símile, quando positivos para estes últimos marcadores. Além desses, também foi caracterizado outro subtipo designado como “mama normal”, que demonstra negatividade para todos os cinco marcadores tumorais utilizados (NGUYEN, P. L. et al. 2008).

Clinicamente, o grupo Luminal A apresenta o melhor prognóstico, vindo a seguir o Luminal B. Esses dois subtipos são os que apresentam maior diferenciação tecidual, aproximando-se do tecido mamário normal. A seguir, o grupo HER-2 e, o tipo basal-símile, que são os de pior prognóstico clínico e de maior complexidade terapêutica (LOI SM, 2006).

Segundo o INCA (2016), o tratamento do câncer de mama depende de certas condições do paciente, tais como: idade, menopausa, comorbidades e características pessoais, além do estadiamento da doença (associado ao prognóstico da doença) e de suas

características biológicas. O tratamento tem maior potencial curativo se a doença for diagnosticada logo no início. Em caso de evidência de metástases, o tratamento busca melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência do paciente (INCA,2016). O tratamento atual do câncer de mama pode ser local por cirurgia e radioterapia, ou tratamento sistêmico, pela quimioterapia citotóxica, terapia hormonal e terapia biológica (VIANNNA-JORGE R., 2013).

A quimioterapia pode ser efetuada com a administração de um ou mais agentes quimioterápicos. Levando em conta a sua finalidade, ela pode ser classificada em: (a) curativa: onde o objetivo é conseguir o controle por completo do tumor; (b) adjuvante: tem por meta eliminar células residuais locais ou circulantes, sendo que essa modalidade se segue após a cirurgia curativa; (c) neoadjuvante: tem por objetivo reduzir parcialmente o tumor, para posterior complementação com a cirurgia ou radioterapia; e (d) paliativa: tem por finalidade a melhora da qualidade de vida, e não visa à cura (INCA,2013).

O benefício clínico estabelecido de utilizar terapia neoadjuvante sistêmica consiste em ocorrer *downstaging* de tumores grandes, inflamatórios e localmente avançados com o objetivo de aumentar as opções cirúrgicas (VERONESI U,1990). É bem estabelecida a correlação entre o prognóstico da doença com a ausência de tumor invasivo residual após terapia neoadjuvante. Entre os vários regimes utilizados nesse cenário, temos os baseados em antraciclinas e taxanos como o padrão de cuidado em câncer de mama (KAUFMANN M,2010).

Avaliação da resposta clínica pode ser feita através de mensuração clínica-imagiológica ou por avaliação na peça cirúrgica (patológica) (SETHI D, 2013). O critério RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*) é mundialmente aceito e tem sido utilizado na determinação dos objetivos dos estudos clínicos, seja por investigadores, grupos acadêmicos, indústria farmacêutica ou entidades governamentais. Foi publicado em 2000 e revisado em 2009. Consiste na avaliação da dimensão tumoral, devendo ser mensurável uni ou bidimensionalmente. O critério de resposta: Resposta completa com o desaparecimento do tumor; Resposta parcial (RP): 30% de redução da soma das lesões tumorais em relação às medidas iniciais; Doença estável (DE) com qualquer resultado que não qualifique como resposta ou progressão, ou aparecimento de nova lesão; Progressão da doença (PD): 20% no aumento da soma das lesões tumorais em relação às medidas iniciais (EISENHAUER EA, 2009). Já a avaliação da resposta patológica pode ser encontrada de forma completa, quando não é visualizado nenhuma célula tumoral residual, incluindo Carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Resposta parcial quando ocorre redução de mais de 50% das células tumorais viáveis,

doença estável quando menos de 50% de redução ocorre ou nenhuma mudança e doença progressiva quando houver aumento de pelo menos 25% das células tumorais viáveis (SETHI D, 2013).

Vários parâmetros conhecidos podem influenciar a resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama, entre eles podemos citar o tamanho e grau do tumor, receptor de estrógeno (RE) e status HER-2 (ROUZIER R, 2005). Existem fatores genéticos que podem influenciar a disponibilidade e a resposta as drogas utilizadas. Entre esses fatores, o transportador de drogas (influxo e efluxo), ABCB1, é um potencial candidato.

2.3. Polimorfismos genéticos

Mutações e polimorfismos são dois tipos de alterações genéticas encontradas na população. Ambas são caracterizadas por alterações nas sequências de nucleotídeos do material genético, porém possuem características distintas em relação a sua frequência em uma dada população. As mutações são representadas pela substituição de bases e alterações na organização ou no tamanho das sequências de DNA (ácido desoxirribonucléico) (BRASILEIRO-FILHO G, 1998). Os polimorfismos são variantes individuais no genoma e ocorrem na população geral de forma estável, onde sua frequência é de 1% ou superior (AYOUB N, 2011).

Na sequência de DNA, os polimorfismos podem reduzir ou aumentar a atividade do gene codificado, sendo que estes podem ser: polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), microssatélites, minissatélites, deleções e inserções (AYOUB N, 2011). Uma das formas mais estudadas são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), os quais são definidos como polimorfismos resultantes da substituição de um nucleotídeo por outro (AYOUB N, 2011).

Em muitos medicamentos usados, os transportadores de drogas, são importantes na absorção, acumulação no tecido e eliminação do organismo, podendo influenciar na eficácia/toxicidade da droga. A alta concentração de drogas pode resultar em toxicidade causando reações adversas (ISHIKAWA T, 2012). Por outro lado, a falta de eficácia da droga pode resultar em redução da terapêutica, por conta da exposição e/ou mutações de alvos de drogas. Os transportadores de membrana têm sido reconhecidos por sua contribuição na variabilidade frente à exposição da droga e sua resposta (ISHIKAWA T, 2012).

Atualmente os SNPs têm sido amplamente considerados nos estudos da variabilidade de resposta a cada indivíduo frente a diversos fatores, tais como resposta a fármacos, resposta inflamatória e resposta imune.

2.4. Gene ABCB 1 e glicoproteína P

As células podem expressar mecanismos que conferem resistência a várias drogas, conhecidos como resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN MM, 1993). O fenótipo MDR é definido como a capacidade das células resistirem à citotoxicidade de drogas, sendo considerado o principal mecanismo de insucesso no tratamento de tumores (GOTTESMAN MM, 2002). Em seres humanos, ocorrem dois subtipos de genes da família MDR, denominados MDR1 e MDR2, sendo que apenas o gene MDR1 confere o fenótipo de resistência (NG WF, 1989). Na década de 80, o gene MDR1 foi mapeado na região 7q21.12 do genoma humano, e possui 28 exons, tendo tamanho de 209 Kb (FOJO A, 1986).

O gene ABCB1, também conhecido como gene de resistência a multidrogas 1 (Multidrug Resistance gene - MDR1), é responsável pela codificação da glicoproteína-P da membrana celular. Esta proteína transportadora é responsável pelo efluxo celular dependente de ATP (Adenosina Trifosfato) de uma variedade de drogas, xenobióticos, metabólitos celulares (ZHOU SF, 2008) e agentes anticancerígenos estruturalmente independentes (REIS M, 2006), reduzindo a exposição do ambiente intracelular a compostos com potencial tóxico.

A glicoproteína-P possui duas subunidades, sendo que cada uma tem 12 segmentos transmembrana, 1280 aminoácidos e peso molecular aproximado de 170 kDa (MARZOLINI C, 2004). Ela é expressa em vários tecidos não tumorais, como intestino, fígado, rim, e em diversos tumores apresenta baixa expressão, que aumenta após administração de medicamentos que sejam seus substratos. Este aumento está relacionado com a resistência a quimioterápicos como cisplatina, antraciclina e vincristina, ao passo que, clinicamente, a expressão elevada se associa com a diminuição da taxa de remissão e sobrevida (RUBER PC, 2010).

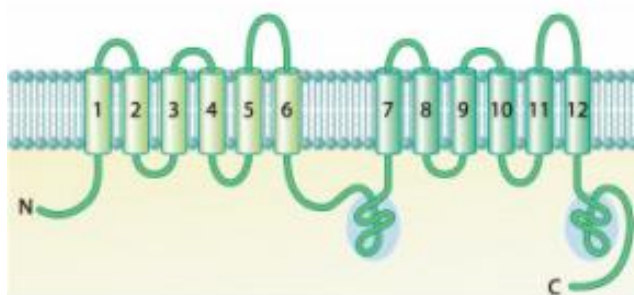


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P. A glicoproteína-P possui dois domínios homólogos, em que cada um contém seis domínios transmembranares,

que conferem especificidade para o substrato e um domínio de ligação ao ATP, permitindo o transporte do substrato ao longo da membrana retirado de (CANNON, LAMPING et al. 2009).

2.5. Polimorfismo gene ABCB1

As inúmeras variações na forma de como diferentes indivíduos respondem aos tratamentos farmacológicos são constantemente observadas e podem resultar de diferenças genéticas em enzimas de metabolização e em proteínas de transporte de drogas (EFFERTH, 2005). Os polimorfismos genéticos podem alterar a expressão de receptores celulares que atuam com a função de transportar diversas substâncias. Esses transportadores se localizam principalmente nas células intestinais, no epitélio renal e nas células hepáticas, sendo responsáveis pela absorção, eliminação e biodisponibilidade de vários medicamentos (SAKAEDAT, 2002). A afinidade do transportador pelo substrato pode resultar em alterações na absorção e na eliminação de medicamentos. A resistência celular a diversas drogas vem sendo considerada uma das barreiras mais significativas ao tratamento efetivo de diversas infecções e doenças.

As células podem expressar mecanismos que conferem resistência a várias drogas, conhecidos como resistência a múltiplas drogas (MDR). Os polimorfismos mais estudados e citados são aqueles presentes do gene *MDR1*, como os SNPs C1236T, G2677T/A e C3435T. Recentemente, foram analisadas combinações genotípicas dos três principais polimorfismos, observando que apenas o polimorfismo da posição 3435 está envolvido neste processo, reafirmando os resultados publicados por estudos anteriores (WANG D, 2005).

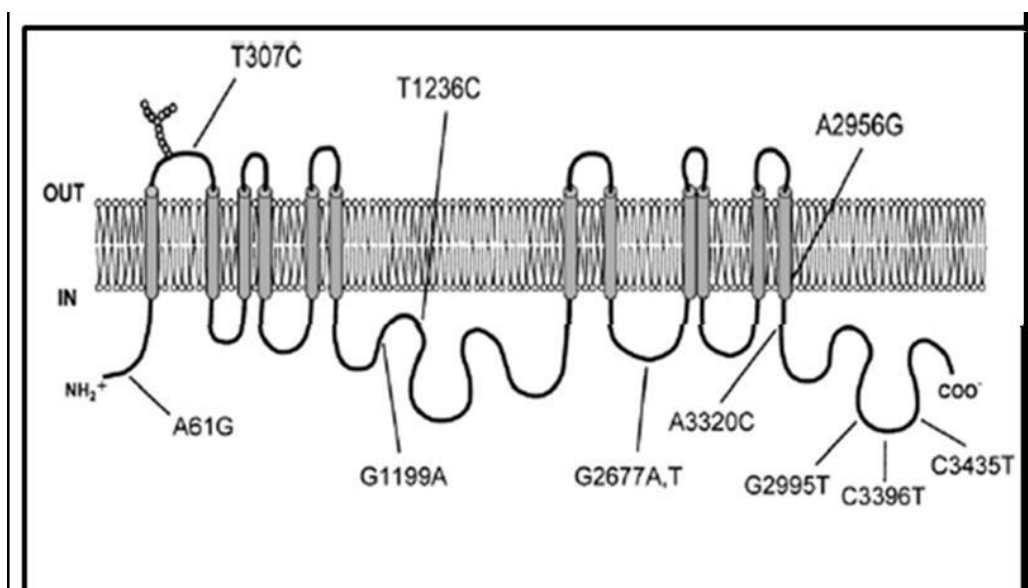


Figura 2 – Localização dos polimorfismos do gene MDR1 na proteína Pgp(SAKAEDA T,2005).

O SNP da posição 3435 apresenta as variantes alélicas C e T. Para esse polimorfismo, o alelo tipo selvagem é considerado o alelo C. Tem sido demonstrado que o polimorfismo C3435T, apesar de ser uma alteração silenciosa que codifica o aminoácido isoleucina, afeta a expressão e atividade da glicoproteína-P em muitos aspectos. Estudo funcional demonstrou que o genótipo TT está associado com expressão inferior da glicoproteína-P quando comparado com o genótipo CC, sendo que esta correlação do polimorfismo C3435T com expressão da proteína e RNAm nem sempre é encontrada. A expressão elevada da glicoproteína-P em células tumorais, mostrou associação com má resposta à quimioterapia e mau prognóstico. Assim, o efeito deste polimorfismo, o desenvolvimento da resistência às drogas e a recaída após a quimioterapia têm sido extensivamente estudados. Os estudos visam entender a ação da glicoproteína-P que pode proteger o organismo de xenobióticos, agentes ambientais e cancerígenos (WANG J, 2012).

O gene ABCB1 é altamente polimórfico, e até o momento foram identificados 66 SNP (polimorfismos de nucleotídeo único). A expressão, efluxo, especificidade do substrato e a estabilidade da glicoproteína P são influenciadas pelos vários SNPs presentes no gene ABCB1 (KIMCHI-SARFATY C, 2007). Portanto, essas variações genéticas afetam o perfil farmacocinético de várias drogas, levando a alterações na sua eficácia e nos efeitos colaterais apresentados (ALLER SG, 2009).

Existe uma variação na resposta as terapias utilizadas no câncer de mama entre indivíduos. Esses desfechos são mensurados através de resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante, quimiotoxicidade e sobrevida global. No polimorfismo do gene ABCB1 ocorre alteração na eficácia da droga, toxicidade e taxa de sobrevida, uma vez que existe variação na expressão da glicoproteína P. Assim, a farmacogenética ajudará na avaliação de indivíduos predispostos a pobre resposta a quimioterapia neoadjuvante, alto risco de toxicidade induzida pela quimioterapia e sobrevida global diminuída (LEVY P, 2013).

No estudo de Kafka e colaboradores (2003) com 68 mulheres, foi observada a associação da variante 3435T e uma melhor resposta à quimioterapia frente às antraciclina, no tratamento de câncer de mama, localmente avançado, com ou sem taxanos.

Devido a ausência de resultados e, considerando o importante papel do polimorfismo do gene ABCB1, no processo resposta à quimioterapia do câncer de mama, realizamos esse estudo para avaliar o seu papel como marcador de resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres brasileiras.

3. JUSTIFICATIVA

Segundo os estudos realizados anteriormente tais como: RODRIGUES FF (2008), VIANA JORGE (2013), KAFKA A, (2003), tem procurado uma associação com os chamados biomarcadores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama, que poderiam modificar a evolução da doença, levando à melhores taxas de sobrevida. O polimorfismo no gene ABCB1 é um dos mais estudados e existem correlações controversas da literatura (CHEN B, 2009), entre esse e a resposta à quimioterapia neoadjuvante, associado a ausência de trabalhos relevantes em populações da América do Sul sobre o tema, nos incentivaram a realizar essa pesquisa com mulheres brasileiras.

3.1 Relevância e contribuição.

Este estudo visa investigar a distribuição de SNPs em gene ABCB1 em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante, avaliando a sua correlação com a resposta clínica.

Caso encontremos uma associação significativa de algum genótipo específico deste polimorfismo com resposta a quimioterapia neoadjuvante em mulheres com câncer de mama, este poderia ser considerado um novo marcador oncogênico que modificaria a conduta médica, frente as mulheres portadoras dessa neoplasia, principalmente dentro da Região Norte do Ceará.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre o polimorfismo (SNPs) do gene ABCB1 C3435T com a resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com câncer de mama.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a distribuição genotípica desse polimorfismo genético em mulheres brasileiras com câncer de mama.
- Avaliar a correlação desse polimorfismo genético com os achados patológicos e imunohistoquímicos nas pacientes com câncer de mama.

5.METODOLOGIA

5.1. Desenho (Tipo de Estudo)

Trata-se de um estudo observacional e prospectivo de mulheres com diagnóstico histopatológico de câncer de mama, estágio clínico III, sem tratamento prévio, submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

5.2. Casuística

Serão colhidas amostras de escovado de mucosa bucal com escova do tipo “cytobrush®” de 50 mulheres com diagnóstico de CM, estágio clínico III que serão submetidas a quimioterapia neoadjuvante atendidas no Serviço de Mastologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral – CE e Ambulatório do Centro de Especialidades Médicas (CEM) da Secretaria de Saúde do município de Sobral – CE.

O diagnóstico de carcinoma de mama foi realizado inicialmente através de exame clínico e radiológico (mamografia e/ou ultrassonografia), sendo posteriormente confirmado pelo estudo histopatológico da peça cirúrgica. O estadiamento utilizado foi o (TNM) da *American Joint Committee on Cancer*. Ele utiliza três critérios para avaliar o estágio do câncer: o próprio tumor, os linfonodos regionais, e se ocorreu disseminação do tumor para outros órgãos. TNM é abreviatura de tumor (T), linfonodo (N) e metástase (M). Para cada classificação existem subcategorias representadas por números. Para o T temos subcategorias

de 1 a 4; N, 0 a 3 e M, 0 a 1. Estas combinações possibilitam a classificação do estagio do tumor. A avaliação da resposta à quimioterapia foi realizada através da análise patológica da peça operatória após o procedimento cirúrgico e clínica-radiologicamente após o ultimo ciclo de quimioterapia neoadjuvante.

5.3. Critérios

Critérios de inclusão:

- Confirmação histopatológica de câncer de mama, com estágio clínico II e III.

Critérios de exclusão:

Intolerância à quimioterapia que impossibilitou a conclusão do tratamento neoadjuvante;

- Mulheres grávidas.
- Homens com câncer de mama
- Câncer de mama metastático
- Câncer de mama bilateral

5.4. Coleta dos dados

A colheita do raspado bucal, com à utilização de escovinha *cytobrush*, foram realizadas no período de julho/2017 a dezembro/2017, mediante assinatura de termo de consentimento pelas pacientes envolvidas no estudo, após liberação da Comissão de Ética em Pesquisa da instituição.

Será utilizado formulário padronizado para a coleta dos dados referentes ao estudo de todas as pacientes que, serão, posteriormente transferidos para planilha eletrônica (Excel – Microsoft Office 2007).

Serão avaliadas as características clínicas, anatomopatológicas e imunohistoquímicas das mulheres com câncer de mama e a correlação com a resposta à quimioterapia e o polimorfismo do gene ABCB1

5.5. Material e métodos

5.5.1. Análise estatística

Os dados foram expressos em forma de média e desvio padrão e após categorização em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson.

As análises foram realizadas no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20,0 para Windows adotando uma confiança de 95%.

5.6. Ensaio Laboratorial

5.6.1. Extração de DNA

As amostras teciduais obtidas da raspagem bucal, serão conservadas em -80°C para posterior extração de DNA genômico. A extração do DNA foi realizada segundo protocolo do *Kit GFX® (Amersham-Pharmacia)* para células teciduais e sanguíneas. O material obtido será inicialmente centrifugado, desprezando-se o sobrenadante. O DNA assim obtido estará pronto para ser utilizado em PCR.

5.6.2. Realização do PCR

O equipamento destinado à realização do PCR em tempo real associa um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação.

A quantificação do produto amplificado é realizada através de comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade dos sinais de fluorescência, gerados durante os ciclos de amplificação, com as concentrações conhecidas de uma sequência idêntica a que se quer quantificar.

Após o preparo do *mix* de reação e do preparo da placa com as amostras específicas esta é pré-lida em um instrumento de PCR em Tempo Real 7.300 (*Applied Biosystems*). Após a pré-leitura, inicia-se os ciclos termais para amplificação das amostras de DNA para a genotipagem das pacientes, representadas nas figuras 3 (padrão heterozigoto CT), figura 4 (homozigoto CC) e figura 5 (homozigoto TT) No final realiza-se uma pós-leitura (da qual foram descontados os valores iniciais de fluorescência em cada amostra), que é analisada

através do *SDSSoftware v. 1.3.1* para a discriminação alélica baseada em controles positivos pré-estabelecidos.

Figura 3 - Padrão heterozigoto (CT)

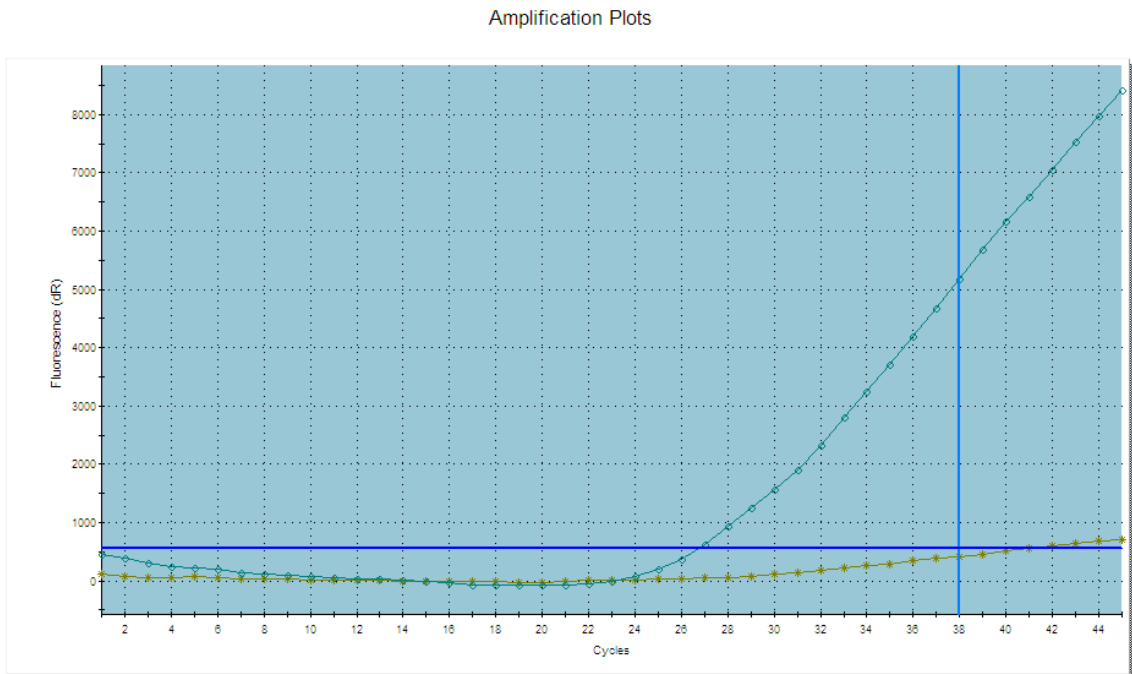


Figura 4 - Padrão homozigoto (CC)

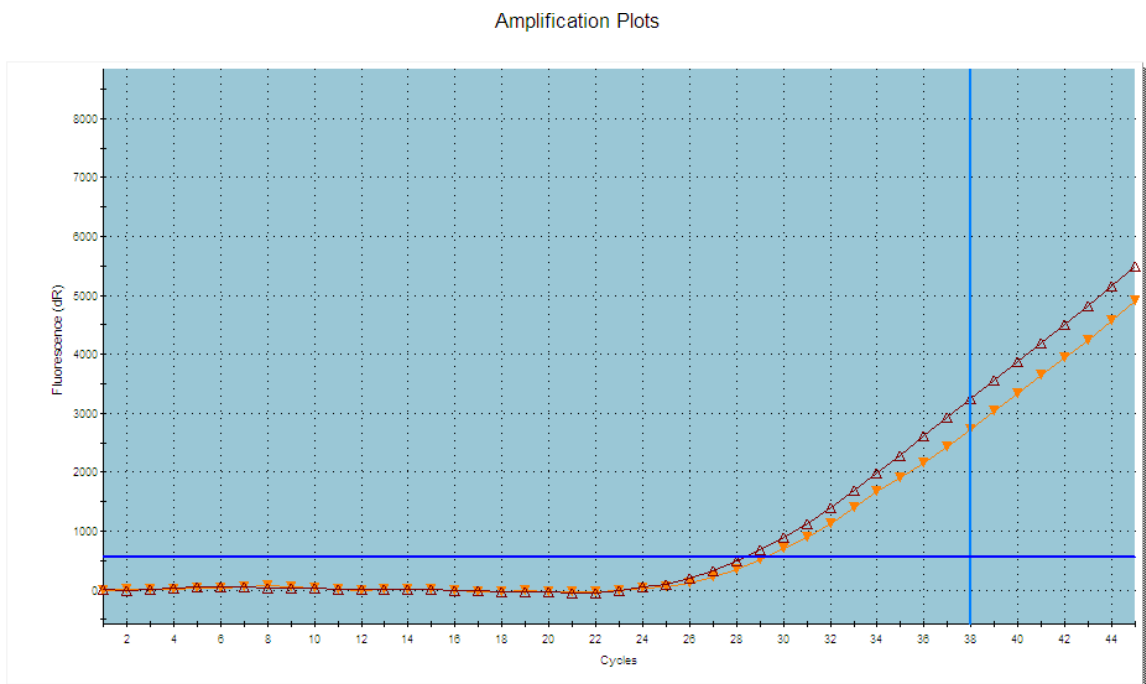
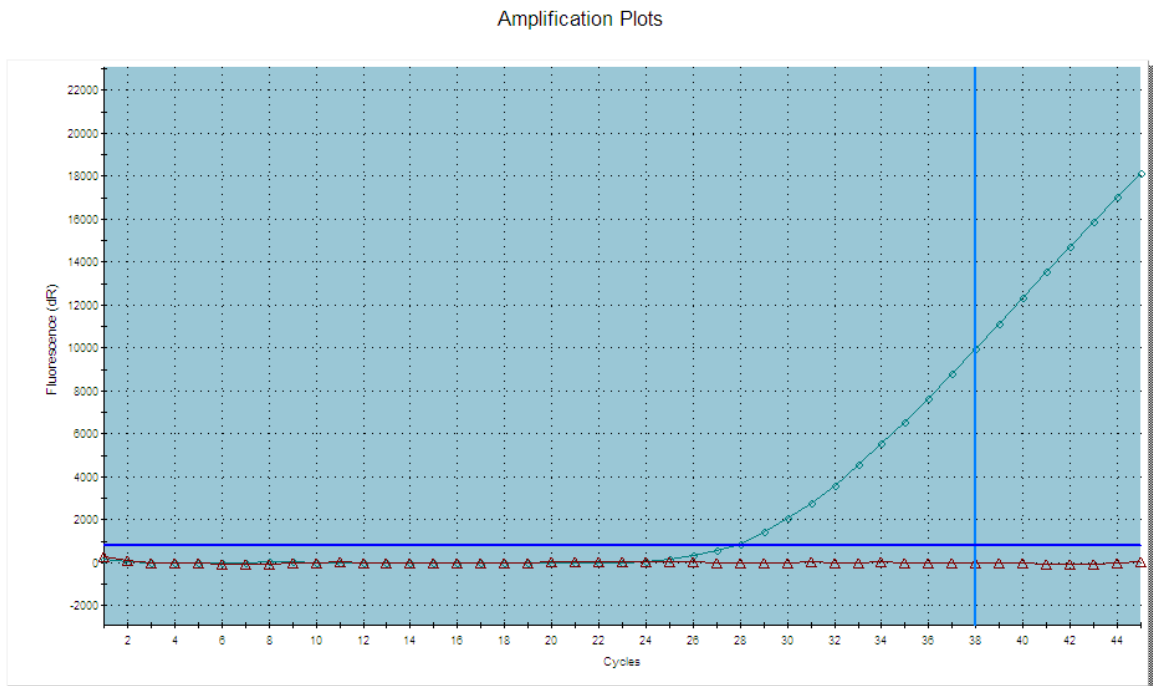


Figura 5 -Padrão homozigoto (TT)

5.7. Aspectos éticos da pesquisa

O cuidado ético fundamental do estudo será manter em sigilo o nome das mulheres envolvidas na pesquisa. Para tanto, cada caso foi identificado no instrumento de coleta de dados, apenas pelo número do prontuário, iniciais do nome e número do caso da pesquisa.

O estudo leva em consideração e se adequa a Resolução 466/12, a qual trata das diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e seus fundamentos éticos e científicos.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição (**anexo**). Todos os pacientes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido, sendo informados dos riscos e benefícios do estudo.

6. RESULTADOS

6.1 Características gerais

Foram analisadas, 32 pacientes portadoras de câncer de mama que foram submetidas a quimioterapia neo-adjuvante. Todas as pacientes se apresentavam no estágio III.

Destas pacientes, metade apresentavam 50 anos ou mais, não tinham histórico familiar de cancer, não eram tabagistas, tiveram sua menarca em 63,3% dos casos após os 12 anos (19 pacientes), menopausa após os 45 anos em 51,9% (14 pacientes). Na Tabela 1, também estão descritas as características referentes ao tumor, bem como o estadiamento, sendo preponderante os T3 em 68,2% (15 pacientes) e N1 em 79,2% (19 pacientes).

Em relação aos receptores hormonais, 27 pacientes (84,4%) apresentavam receptores hormonais positivos, status positivo (62,5%) relação ao HER-2(20 pacientes), Ki67 >15% em 22 pacientes (68,8%), tamanho tumoral menor que 5 cm em 73,1% (19 pacientes) e resposta parcial à quimioterapia neoadjuvante em 28 casos (87,5%).

O polimorfismo estudado apresentou os seguintes genótipos: 10(31,2%) eram homozigotos (C/C), 08(25%) eram homozigotos (T/T) e 14(43,8%) eram heterozigotos.

Na tabela 1, são categorizadas as características clinico-epidemiológicas.

Tabela 1: Categoria das características clinico-epidemiológicas gerais.

Dados epidemiológicos	N	%
Genótipo SNP		
Heterozigoto	14	43,8
Homozigoto T/T	8	25,0
Homozigoto C/C	10	31,2
Idade (51,56±11,15)		
Até 50	16	50,0
Mais de 50	16	50,0
Histórico familiar		
Não	20	62,5
Sim	12	37,5
Tabagismo		
Não	25	78,1
Sim	7	21,9
Idade Menarca (13,23±2,18)		
Até 12	11	36,7
Mais de 12	19	63,3
Idade Menopausa (44,30±6,26)		
Até 45	13	48,1
Mais de 45	14	51,9
Idade primeiro parto (20,61±5,75)		
Até 20	12	52,2
21-30	9	39,1
Mais de 30	2	8,7
Gestações (3,16±1,49)		
1	4	16,0
2-3	11	44,0
>3	10	40,0

Dados referentes ao tumor**T**

1	1	4,5
2	2	9,1
3	15	68,2
4	4	18,2

N

0	2	8,3
1	19	79,2
2	3	12,5

Receptores hormonais

Negativo	5	15,6
Positivo	27	84,4

HER2

Negativo	12	44,4
Positivo	10	62,5

ki67 (31,07±26,26)

<15%	10	31,3
>15%	22	68,8

Máximo tamanho (7,07±3,31)

Até 5cm	7	26,9
Mais de 5cm	19	73,1

Mínimo tamanho (6,31±2,87)

Até 5cm	9	37,5
Mais de 5cm	15	62,5

Resposta a QT neoadjuvante

Parcial	28	87,5
Completa	4	12,5

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual ou média e desvio-padrão.

Em relação às características relativas ao tumor apresentados na tabela 2, maioria das pacientes se apresentavam em estágio clínico T, referente as tumores maiores que 5 cm (68,2%) e N1, tumores que apresentam linfonodos axilar positivo (79,2%). Em torno de 85% das pacientes (27) apresentavam receptores hormonais positivos (RE ou RP), c-erb B2 positivo em 62,5% e ki-67 >15% em 22 casos. A resposta a quimioterapia neoadjuvante foi avaliada de acordo com o critério RECIST e classificada como parcial em 87,5% (28 casos) e completa em 12,5% (4 casos). Ainda, referente à tumoração, foi evidenciado que a maioria dos tumores (73,1%) apresentava diâmetros maiores que 5cm.

6.2. Relação dos genótipos do polimorfismo C3435T

Foram empregados os testes de associação (exato de Fisher ou Qui-quadrado) para avaliarmos a relação dos genótipos testados e resposta a quimioterapia neoadjuvante, bem como a resposta linfonodal após a terapia.

Tabela 2: Característica clínico-epidemiológica (Homozigoto TT).

	Genótipo				p-Valor	OR	IC 95%	
	C/T + C/C		TT					
Resposta a QT neoadjuvante								
Parcial	21	87,5%	7	87,5%	1,000	1,00	0,09	11,24
Completa	3	12,5%	1	12,5%		1		
Resposta linfonodo pós QT								
Negativo	7	29,2%	4	50,0%	0,397	0,41	0,08	2,13
Positivo	17	70,8%	4	50,0%		1		
Receptores hormonais								
Negativo	5	20,8%	0	0%	0,296	4,80	0,24	96,87
Positivo	19	79,2%	8	100,0%		1		
HER2								
Negativo	11	45,8%	1	12,5%	0,204	5,92	0,63	55,88
Positivo	13	54,2%	7	87,5%		1		
ki 67								
<15%	8	33,3%	2	25,0%	1,000	1,50	0,25	9,18
>15%	16	66,7%	6	75,0%		1		

*p<0,05, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Na tabela 2, foi observado que não ocorreu associação com relevância estatística em nenhum dos genótipos e agrupamentos (p>0,05).

Tabela 3: Característica clínico-epidemiológico, (Homozigoto CC)

	Genótipo				p-Valor	OR	IC 95%	
	C/T + TT		CC					
Resposta a QT neoadjuvante								
Parcial	20	90,9%	8	80,0%	0,387	2,50	0,30	20,92
Completa	2	9,1%	2	20,0%		1		
Resposta linfonodo pós QT								
Negativo	10*	45,5%	1	10,0%	0,048	7,50	1,11	69,74
Positivo	12	54,5%	9*	90,0%		1		
Receptores hormonais								
Negativo	2	9,1%	3	30,0%	0,293	0,23	0,03	1,70
Positivo	20	90,9%	7	70,0%		1		
HER2								
Negativo	8	36,4%	4	40,0%	1,000	0,86	0,18	3,98
Positivo	14	63,6%	6	60,0%		1		
ki 67								
<15%	7	31,8%	3	30,0%	1,000	1,09	0,21	5,52
>15%	15	68,2%	7	70,0%		1		

*p<0,05, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Na tabela 3, ocorreu associação com relevância estatística considerando o genótipo e sua relação com o status linfonodal axilar (p<0,05).

Tabela 4: Característica clínico-epidemiológico (Homozigoto TT/CC)

	Genótipo				p-Valor	OR	IC 95%	
	TT		CC					
Resposta a QT neoadjuvante								
Parcial	7	87,5%	8	80,0%	1,000	1,75	0,13	23,70
Completa	1	12,5%	2	20,0%		1		
Resposta linfonodo pós QT								

Negativo	4	50,0%	1	10,0%	0,118	9,00	0,75	108,31
Positivo	4	50,0%	9	90,0%		1		
Receptores hormonais								
Negativo	0	,0%	3	30,0%	0,216	0,13	0,01	2861,00
Positivo	8	100,0%	7	70,0%		1		
HER2								
Negativo	1	12,5%	4	40,0%	0,314	0,21	0,02	2,48
Positivo	7	87,5%	6	60,0%				
ki 67								
<15%	2	25,0%	3	30,0%	1,000	0,78	0,10	6,32
>15%	6	75,0%	7	70,0%		1		

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Na tabela 4, foi observado que não ocorreu associação com relevância estatística em nenhum dos genótipos e agrupamentos ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

7.1 Características gerais

Câncer de mama é uma complexa neoplasia maligna multifatorial causada por fatores genéticos e ambientais, sendo a mais frequentemente diagnosticada e principal causa de óbito por câncer no sexo feminino (IARC GLOBOCAN.2012).

Nos países em desenvolvimento, grande parte dos diagnósticos de câncer de mama ainda são realizados nos estádios avançados, diminuindo a sobrevida e causando maior morbidade entre essas mulheres que, frequentemente, são submetidas a cirurgias mais extensas. O câncer de mama localmente avançado (CMLA) corresponde a 50 % de todos os cânceres de mama em países com recursos limitados e possui um mau prognóstico. No passado, o tratamento para o câncer de mama localmente avançado e não curável por nenhuma técnica cirúrgica existente era realizado apenas de forma paliativa, porém a partir de 1970, o tratamento paliativo foi substituído pela combinação da cirurgia, quimioterapia e radiação, oferecendo a este grupo de pacientes o aumento da sobrevida (SCHWARTZ, 2004).

A terapia sistêmica anterior à cirurgia impede a proliferação de células tumorais metastáticas, garantindo uma maior sobrevida nessas pacientes (FISCHER 2002), além de

garantir benefício clínico em tumores menores, cirurgia mais conservadora e um tratamento adjuvante mais efetivo (CAMERON 1997).

Um dos maiores desafios no tratamento dessa neoplasia é superar a resistência ao tratamento (quimiorresistência) e um principais fatores envolvidos nesse processo é a superexpressão da glicoproteína p devido à ativação do gene ABCB1 (ALSAIF AA, 2013). Essa proteína é responsável pelo efluxo de drogas das células sendo presente em muitos tecidos de forma constitutiva, tais como, no intestino, rins e mamas. O polimorfismo no exón 26 (3435C>T) do gene MDR1 tem um papel fundamental na alteração da funcionalidade da glicoproteína p (HOFFMEYER S, 2000).

Devido a escassa literatura no Brasil abordando esse tema. Foi objetivo desse estudo relacionar a presença do polimorfismo C3435T do gene ABCB1 com a resposta a quimioterapia neoadjuvante. Os parâmetros utilizados para predizer resposta foram principalmente por imagem, considerando o RECIST e clínico-patológica, utilizando os linfonodos ressecados durante o procedimento cirúrgico.

7.2 Polimorfismo e o tratamento

O processo de carcinogênese relacionado a disfunção da proteína ABCB1 pode ser provocado por mutação, seus metabólitos e/ou absorção e acumulação dos conjugados. Então, essa proteína ativada pode ser considerada através de duas formas (CASCORBI I,2010). Poderia ocorrer diante de sua alta atividade funcional, uma proteção tecidual importante contra acúmulo de xenobióticos e, ao considerarmos os casos de tratamento de câncer, poderíamos observar uma pobre resposta a quimioterapia decorrente de um aumento da atividade da glicoproteína P (LESCHZINER G, 2006)

A farmacogenética pode auxiliar nas adaptações ao tratamento, indicando quimioterápicos menos tóxicos e mais sensíveis contra o câncer, melhorando a sobrevida e evitando comprometer a qualidade de vida dos pacientes (KRISTYANO H, 2010).

No atual estudo, a presença do polimorfismo C3435T de acordo com os genótipos foram descritos como CC (31,2%), CT (43,8%) e TT (25%). Um estudo realizado na Turquia (KAFKA A, 2003) encontrou uma frequência significativa ($p<.01$) do alelo T em 57 pacientes com câncer de mama comparadas com 50 controles saudáveis. Eles demonstraram um risco 1,5 maior de desenvolvimento de câncer de mama em carreadores do alelo T. Contudo, de 68 pacientes com câncer de mama em uma população Caucasiana, somente 22% tinha TT e 20,5% tinha CC. A maioria dos pacientes (57,3%) apresentavam o genótipo CT.

HOFFMEYER S, 2000, relatou que:

“O genótipo TT era associado a reduzida expressão da glicoproteína P e, portanto, uma reduzida eliminação celular e mantendo de altas concentrações plasmáticas de quimioterápicos. Diante desse resultado, foi aventada a hipótese que pacientes com o genótipo 3435TT poderiam ter uma melhor resposta ao tratamento e benefício na sobrevida comparado aos genótipos CC e CT.” (HOFFMEYER, 2000, p.161)

Situação que não foi atestada com nível de significância no presente estudo, estando apenas a presença do alelo T envolvida em uma pior resposta do status axilar à quimioterapia neoadjuvante.

Um estudo coreano (HAN S, 2006) avaliou o impacto clínico do polimorfismo C3435T e a resposta a quimioterapia neoadjuvante. Seus resultados foram semelhantes aos estudos prévios, sendo o genótipo TT associado a maior sobrevida global em relação aos genótipos CT/TT e concentrações plasmáticas mais elevadas de docetaxel e doxorubicina (esquema empregado no estudo). No entanto, ainda de acordo com esse estudo, os homozigotos 3435TT foram expostos a mais episódios de neutropenia febril, diarreia e neutropenia (grau 3-4).

O mecanismo de resistência a múltiplas drogas é um fenômeno complexo e os resultados contraditórios podem ser explicados por interações gene-gene. Nos genótipos TT ocorre um defeito na produção da glicoproteína-p, e com isso, o acúmulo de drogas dentro das células, mas outros mecanismos podem ocorrer resultando em resistência a quimioterapia (ASHARIATI A, 2008). Já em pacientes com genótipo CC, devem existir outros polimorfismos desconhecidos no gene MDR-1, bem como erros na translação na proteína estrutural da glicoproteína-p que podem torna-la defeituosa (CIZMARIKOVA M, 2010).

Nesse estudo, encontramos os genótipos distribuídos como 31,2% eram CC, 25% eram TT e 43,8% eram CT. Outros autores (RODRIGUES FF, 2008) encontraram o padrão 27.9% para CC, 52.2% para CT e 20.3% para TT.

A incidência do SNP C3435T do gene MDR-1 nesse estudo, não se correlacionou com estágio tumoral e graus histológicos e nucleares (KAFKA A, 2003). Havendo significância estatística apenas na presença do alelo T relacionada a pior resposta no status axilar à quimioterapia neoadjuvante.

Em relação a expressão de receptores de estrogênio, progesterona, c-erb B2 e Ki-67 não ocorreu correlação significativa com o polimorfismo C3435T, também demonstrado por outros autores. (DEXTER DW, 1998; KAFKA A, 2003).

A resposta clínica não mostrou correlação de significância estatística com o SNP C3435T, similar aos achados de (KAFKA A, 2003).

8. CONCLUSÃO

A presença do polimorfismo C3435T tem papel discutível levando em consideração a resposta aos quimioterápicos. Baseado na sua premissa de promover o influxo/efluxo das drogas do ambiente intracelular, esperávamos por encontrar de forma significativa mudanças na resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com essa alteração genética. O estudo mostra que não houve diferença estatística entre os genótipos do polimorfismo C3435T, com relação à resposta a quimioterapia neoadjuvante e o perfil molecular determinado por imunohistoquímica, com ressalvas a uma pior resposta do status axilar devido à presença do alelo T. Portanto, não foi possível correlacionar a presença do polimorfismo C3435T com a resposta a quimioterapia neoadjuvante, portanto ressaltamos a necessidade de realização de novos estudos no Brasil envolvendo casuísticas maiores para a validação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- ALSAIF AA, et al. Association of multiple drug resistance-1 gene polymorphism with multiple drug resistance in breast cancer patients from an ethnic Saudi Arabian population. **Cancer epidemiology**. 2013; 37: 762-766.
- ALLER SG, YU J, WARD A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. **Science**. 2009;323(5922):1718–1722.
- ASHARIATI A (2008) Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predict response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer with Her2/neu expression. *Acta Med Indones* 40:187–191
- AYOUB N, LUCAS C, KADDOUMI A. Genomics and pharmacogenomics of breast cancer: current knowledge and trends. **Asian Pacific J Cancer Prev**. 2011; 12: 1127-1140.
- BONADONNA G, VERONESI U, BRAMBILLA C et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82: 1539–1545.
- BRASILEIRO-FILHO G, GUIMARÃES RC, BOGLIOLO L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: **Brasileiro-Filho G (Ed.). Patologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998:148-92.
- CAMERON, D.A.; ANDERSON, E.D.; LEVACK, P. et al. Primary systemic therapy for operable breast cancer—10-year survival data after chemotherapy and hormone therapy. *Br J Cancer*; v. 76, p. 1099-1105, 1997.
- CANNON, R. D., E. LAMPING, et al. (2009). "Efflux-mediated antifungal drug resistance." **Clin Microbiol Rev** 22(2): 291-321, Table of Contents.
- CASCORBI I, Haenisch S: Pharmacogenetics of ATPbinding cassette transporters and clinical implications. *Methods Mol Biol*, 2010, 596, 95–121.
- CHEN B, FANG J, ZHANG W, JIN Z, YU Z, CAI W. Detection of C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphism of MDR1 by Amplication Refractory Mutation System PCR. **J Clin Lab Anal**. 2009; 23: 110-116.
- CIZMARIKOVA M, Wagnerova M, Schonova L et al (2010) MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J* 10:62–69
- DE BROT, M. et al. Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. **Rev Assoc Med Bras**. 2009 Sep-Oct;55(5):529-34. Portuguese. PubMed PMID: 19918651.
- DEXTER DW, Reddy RK, Geles KG, Bansal S, et al. (1998). Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 4: 1533-1542.

EFFERTH T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. **Pharmacology and Therapeutics**. 2005; 107: 155-176.

EISENHAEUER EA, THERASSE P; BOGAERTS J, SSCHWARTZ LH, SARGENT D, FORD R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer**. 2009;45(2):228-47.

FARBER E, CAMERON R. The sequential analysis of cancer development **Adv Cancer Rev** 1980; 31: 125-226.

FISHER, B.; SAFFER, E.; RUDOCK, C. et al. Effect of local or systemic treatment prior to primary tumour removal on the production and response to a serum growthstimulating factor. *Cancer Res*; v. 49, p. 2002-4, 1989.

FOJO A, LEBO R, SHIMIZU N, et al. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. **Somat Cell Mol Genet** 1986;12:415-20.

GOTTESMAN MM, FOJO T, BATES SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATPdependent transporters. **Nat Rev Cancer** 2002;2:48-58.

GOTTESMAN MM, PASTAN I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu Rev Biochem** 1993;62:385-427.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer: The next Generation. **Cell** 2011. 144(5): 646-67.

HAN S, KIM SB, KANG SS et al. A phase II study of neoadjuvant docetaxel plus doxorubicin (KBCS-01) in stage II, III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98: 57–61.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

HOFFMEYER S, Burk O, von Richter O, et al. 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 USA* 2000; 97:3473-8

IARC Globocan. International agency for research on cancer. 2012.

(INCA)INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA[online]. [acesso: 2017 set 17]. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - Quimioterapia [online]. [acesso: 2014 abr 13]. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101.

ISHIKAWA T. Recent advances in pharmacogenomics of ABC transporters involved in breast cancer therapy. **Pharmacogenomics**. 2012; 13(6): 633-636.

KAFKA A, SAUER G, JAEGER C, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003; 22:1117-21

KAFKA A, SAUER G, JAEGER C, GRUNDMANN R, KREIENBERG R, ZEILLINGER R, DEISSLER H. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Int J Oncol** 2003; 22:1117-1121.

KAUFMANN M, MORROW M, VON MINCKWITZ G et al. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. **Cancer** 2010; 116:1184–1191.

KEAM B, Im SA, Kim HJ et al. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II / III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. **BMC Cancer** 2007; 7: 203.

KIMCHI-SARFATY C, OH JM, KIM IW, et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**. 2007;315(5811):525–528.

KRISTYANTO H, Utomo AR. Pharmacogenetic application in personalized cancer treatment. **Acta Med Indones- Indones J Intern Med**. 2010; 42(2): 109-115.

LESCHZINER G, Jorgensen AL, Andrew T, Pirmohamed M, Williamson PR, Marson AG, Coffey AJ et al.: Clinical factors and ABCB1 polymorphisms in prediction of antiepileptic drug response: a prospective cohort study. **Lancet Neurol**, 2006, 5, 668–676.

LEVY P, GLIGOROV J, ANTOINE M, et al. Influence of ABCB1 polymorphisms and docetaxel pharmacokinetics on pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**. 2013;139(2):421–428

LOI SM, DEMONTY G, DESMEDT C, et al. Genomic and molecular classification of breast cancer; in **breast cancer management and molecular medicine: towards tailored approaches**. Springer, 2006.

MARZOLINI C, PAUS E, BUCLIN T, KIM RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 2004; 75(1): 13-33.

MILLER LD, SMEDS J, GEORGE J et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects and patient survival. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005;102:13550.

NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**. 2008 May 10;26(14):2373-8.

NG WF, ZASTAWNY RL, VENOT-DREBOT L, et al. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. **Mol Cell Biol** 1989;9:1224-1232.

PAYANDEH M, SADEGHI M, SADEGHI E. Differences in prognostic factors between early

and late recurrence breast cancers. **Asian Pac J Cancer Prev**, 16, 6575-9. 2015.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopathology**. 2008;52(1):67-81.

REIS M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 2006; 39(4): 577-586.

ROCHA JCC, VARGAS FR, ASHTON-PROLLA P. Cancer familiar. In: **Projeto Diretrizes**. 1ª ed. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2001.

RODRIGUES FF, Santos RE, Melo MB et al (2008) Correlation of polymorphism C3435T of the MDR-1 gene and the response of primary chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res* 7:177–183

RUBER PC, MARUIAMA CH, ALMEIDA WP. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Quim Nova**. 2010; 33(10): 2148-2154.

SAKAEDA T, NAKAMURA T, OKUMURA K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Biol Pharm Bull**. 2002;25:1391-400.

SCHWARTZ, G.F.; HORTOBABYI, G.N.; et al. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast. *Breast J*; v. 10, p. 273-94, 2004.

SETHI D, SEN R, PARSHAD S1, KHETARPAL S, GARG M, SEN J2 ; Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Indian Journal of Cancer** 2013;50: 58-64.

SILVA RL. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: **Oncologia Molecular**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a populationbased study from the South of Switzerland. **Ann Oncol**. 2009 Apr;20(4):628-35. doi: 10.1093/annonc/mdn675. Epub 2008 Dec 12. PubMed PMID: 19074747.

STEPHENS P, EDKINS S, DAVIES H et al. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns os somatic mutations in human breast cancer. **Nature Genetics** 2005;37:590.

The Human Genome. Disponível em: <<http://genome.wellcome.ac.uk/>>. Acesso em: 28 de Março de 2011.

VIANNNA-JORGE R, FESTA-VASCONCELLOS JS, GOULART-CITRANGULO SMT, LEITE MS. Functional polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and their impact on the therapy of breast câncer. **Frontiers in Genetics**. 2013; 3(329): 1-19.

WANG D, JOHNSON AD, PAPP AC, DEANNA LK, SADÉE W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435>T affects mRNA stability. **Pharmacogenet Genomics**. 2005; 15:693-704.

WANG J, WANG B, BI J, LI K, Di J. MDR1 gene C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 34 case-control studies. **J Cancer Res ClinOncol**. 2012; 138: 979-989.

ZHOU SF. Structure, function and regulation of P-glicoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**. 2008; 38(7-8): 802-832.

ANEXOS

Anexo 1- Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidada pelo médico e professor José Juvenal Linhares como participante da pesquisa intitulada ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO (SNPS) DO GENE ABCB1 C3435T, COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE, EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Ao assinar este termo, você declara que aceitou submeter-se aos seguintes procedimentos e que o médico José Juvenal Linhares explicou com clareza todas as seguintes etapas do protocolo de coleta de dados.

- **RASPADO BUCAL:** O material será colhido por escovado de mucosa bucal com escova do tipo “cytobrush®”, sendo o material armazenado em tubos secos. O procedimento será realizado através da fricção de um escovinha na parte interna da bochecha e em seguida a paciente bochechará 5 mL de soro fisiológico e colocará em um tubo de vidro de 20mL. O material será enviado ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS – UFC) para análise.

- **ENTREVISTA:** O pesquisador fará os seguintes questionamentos:

Nome completo; idade; estado civil; profissão; queixa principal; menarca; menopausa; idade do primeiro parto; número de gestações prévias; número de partos prévios; número de abortos prévios; história familiar de câncer; história prévia de tabagismo.

Os potenciais riscos são: condições clínicas que podem escapar do processo de diagnose inicial; assimilação não desejada de potenciais informações inerentes ao processo de coleta da história clínica.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que os polimorfismos estudados poderão estar relacionados com o câncer de mama e que possam vir a serem úteis como medidas de prevenção primária dessa doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

A participante não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa. Além disso, não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

O tempo estimado para a realização da entrevista é de 10 minutos. A paciente responderá 13 perguntas.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. A participante tem o direito de ser atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

A pesquisa ocorrerá nas seguintes instituições: Centro de Especialidades Médicas Doutor Aristides Andrade.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para

esta pesquisa.

O estudo leva em consideração e se adéqua a Resolução 466/12, a qual trata das diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e seus fundamentos éticos e científicos.

O pesquisador responsável garante que as informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

A sua contribuição será de grande valia para o desenvolvimento e progresso das pesquisas em pacientes com câncer de mama.

Endereço do responsável pela pesquisa:

Nome: José Juvenal Linhares
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Endereço: Avenida Comandante Maurocelio Rocha Pontes, 100, Derby, Sobral, Ceará.
Telefones para contato: (88) 99922-3776

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ___anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Sobral, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
Nome da testemunha (se o voluntário não souber ler)	Data	Assinatura
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura

Anexo 2 – Ficha de coleta de dados das mulheres do estudo*QUESTIONÁRIO APLICADO AS PACIENTES*

DATA: ___/___/___.

No. do Protocolo: _____

Identificação:

Nome: _____ Idade: _____ Registro: _____

Estado Civil: _____ Profissão: _____ Raça: _____

Resumo Clínico:

Queixa Principal:

Mamografia:

Estadiamento Clínico (TNM):

T(cm): N(1 e 2):

Anatomia Patológica (pós cirúrgico):

T: N:

Antecedentes Gineco-obstétricos:**1** Menarca:**2** Menopausa:**3** Idade do primeiro parto:**4** Gestações:**História Familiar:** () sim () não**Tabagismo:** () sim () não**Imuno-histoquímica:****RE** + () - ()**RP** + () - ()**Cerb2 ou Her2** +/+++ () ++/+++ () +++/+++ ()**KI67** _____%**Terapêutica instituída previamente a colheita do material:***Quimioterapia* +() *Quadrantectomia/esvaziamento axilar + RT*() *Mastectomia/esvaziamento axilar + RT*() *outros* _____**Resposta a terapêutica**() *Crescimento tumoral*() *Sem resposta ate 50%*() *Resposta parcial 50 a 99%*() *Resposta clínica completa 100% clinicamente*() *Resposta patológica completa 100% na patologia*() *Metástase*() *Recidiva*

Anexo 4 – Orçamento

Os custos detalhados abaixo, referentes à execução da pesquisa intitulada “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO (SNPS) DO GENE ABCB1 C3435T, COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE, EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA.” serão custeados por custeio próprio (o pesquisador principal assumirá o financiamento do projeto).

ITEM	VALOR R\$
PURELINK KIT DE PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA CÉLULAS SANGUÍNEAS	R\$ 3.011,50
ÁCIDO NUCLEICO INICIADOR 10ML	R\$ 281,97
TAQMAN MASTER MIX GENOTIPAGEM 10 ML	R\$ 3.105,00
Resma de papel A4 – Ripax® (04 Resmas) para uso diário de processamento dos dados	R\$ 60,00
Cartucho de tinta preto para a impressora HP® (05 cartuchos)	R\$ 350,00