

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**POLIMORFISMO rs2242652 DO GENE *hTERT* EM  
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas da Faculdade de  
Medicina da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre.  
Área de Concentração: Medicina

BRASÍLIA, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**POLIMORFISMO rs2242652 DO GENE *hTERT* EM  
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

BRASÍLIA 2019

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**POLIMORFISMO rs2242652 DO GENE *hTERT* EM  
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Aprovado em: 22/05/2019

**Banca Examinadora:**

Presidente: Prof. Dr. João Batista de Sousa  
Instituição: Universidade de Brasília – UnB

Membro: Prof. Dr. João Nunes de Matos Neto  
Instituição: Hospital Universitário de Brasília – HUB

Membro: Prof. Dra. Maria de Fátima Brito Vogt  
Instituição: Universidade de Brasília – UnB

Suplente: Prof. Dra. Ceres Nunes de Resende  
Instituição: Universidade de Brasília – UnB

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM675p Monteiro Alvares Vilela, Miriam  
POLIMORFISMO rs2242652 DO GENE MTERT EM MULHERES COM  
CÂNCER DE MAMA / Miriam Monteiro Alvares Vilela; orientador  
João Batista de Sousa; co-orientador Diego Madureira de  
Oliveira. -- Brasília, 2019.  
46 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Câncer de mama. 2. Telomerase. 3. rs2242652. 4.  
Polimorfismo. I. Batista de Sousa, João, orient. II.  
Madureira de Oliveira, Diego, co-orient. III. Título.

*Aos meus pais, William e Lais,*

*Meus maiores incentivadores*

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador Dr. João Batista, que sempre foi tão prestativo de maneira elegante e eficaz para me ajudar, mesmo quando ainda não me conhecia embarcou nesse projeto comigo acreditando e apostando nos meus sonhos.

Ao meu coorientador e grande idealizador desse projeto, Diêgo Madureira que ao longo desses anos sempre me atendeu com prontidão, abrindo mão dos seus próprios projetos para me ajudar a concretizar essa etapa.

Ao meu querido amigo e mentor em vários momentos, Dr. João Nunes que me inspira todos os dias a querer ser uma mastologista melhor.

À parceira Katherine de Souza por dividir comigo seu conhecimento e suas habilidades tornando esse projeto possível.

Aos meus queridos colegas e amigos Marina Lima, Isaac e Elisa Porto pela imensa ajuda em determinados momentos da execução desse trabalho.

À Dra. Fátima Vogt, Dra. Miriam Wanderley, Dra. Ceres Nunes e Dra. Fernanda Salum que me incentivaram no campo científico desde a residência médica, além de serem médicas admiráveis.

Às minhas queridas pacientes que confiaram em mim durante os momentos mais difíceis de suas vidas e doaram parte de si de maneira altruísta para que pudéssemos ter substratos para o estudo.

Aos meus irmãos, Liliane e Flávio, meus melhores amigos, por me trazerem sempre a realidade, me apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida.

Aos meus cunhados, Ana Carolina, Frederico e Carolina pela parceria e amizade.

Ao meu sobrinho, Arthur por ser tão amável e me mostrar que todas as dificuldades podem ser superadas com amor.

Aos meus pais, que muitas vezes anularam as próprias vidas para que pudéssemos viver as nossas e buscar os nossos sonhos. Por serem tão altruístas comigo e tão presentes sempre. Por me guiarem pelo caminho do bem e dos estudos. Pelo amor incondicional.

Ao meu marido, meu querido Rafael, meu parceiro, meu grande incentivador. Meu equilíbrio, sendo minha razão quando sou muito passional e minha doçura quando sou muito racional.

Aos meus filhos, Gustavo e Fernando por me permitirem viver o maior amor que existe.

À Deus por me amparar, por me guiar e cuidar da minha família em todos os momentos.

## Resumo

**Introdução:** O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres de todo o mundo. Vários são os fatores de risco para esse câncer: sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), terapia hormonal, história familiar, mutações genéticas entre outras.

A grande maioria dos tumores de mama é caracterizada como carcinomas e podem ter origem em ductos ou lóbulos. A avaliação imunohistoquímica está relacionada à expressão do receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP); expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), proliferação celular ou ausência de expressão de qualquer receptor em membrana tumoral.

Os telômeros protegem as extremidades naturais dos cromossomos da perda de DNA (ácido desoxirribonucleico). A telomerase é um complexo proteico ribonuclear (RNA e proteínas) que neutraliza o encurtamento dos telômeros.

Mutações pontuais recorrentes no promotor de *TERT* da telomerase foram identificadas em uma série de cânceres e o polimorfismo rs2242652 é uma alteração de nucleotídeo único e foi descrita associada ao risco de câncer de mama.

**Objetivo:** O objetivo desse trabalho é analisar o polimorfismo *TERT* rs2242652 em mulheres com câncer de mama e testar a correlação de tais dados com o prognóstico e variáveis clínicas diversas.

**Métodos:** O estudo foi conduzido como estudo clínico observacional constituído por mulheres com câncer de mama. Era coletado amostra de sangue da paciente, feito extração do DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) e analisado os polimorfismos da telomerase nessa população. Para análise descritiva os dados planilhados foram utilizados na construção de tabelas e gráficos que foram qualitativamente estudados. As associações foram analisadas por testes de correlação direta seguida de comparação de grupos compostos por categorização.

**Resultados e discussão:** Cinquenta e quatro mulheres apresentaram polimorfismo do gene hTERT da telomerase rs2242652. E foram divididos em dois grupos de acordo com o alelo A ou G que conferiam as variantes gênicas GA/AA e GG.

Foi constatado que o grupo GA/AA teve uma tendência à tumores mais agressivos, apresentando 33% de triplo negativo e 22% de tumor com superexpressão de HER 2, diferente do grupo GG: 19% triplo negativos e 10% com superexpressão de HER2. Tumores mais agressivos, T4, foram mais expressivos no grupo da variante gênica GA/AA representando 20% das pacientes, enquanto no grupo GG eram apenas 8%.

**Conclusão:** Os dados encontrados nesse trabalho da relação do polimorfismo rs2242652 do gene *TERT* da telomerase com o câncer de mama referem uma tendência de tumores de pior prognóstico se associarem à variante gênica ligada ao alelo A desse gene, porém é necessário um número amostral maior para confirmação estatística.

**Palavras-chave:** câncer de mama; telomerase; polimorfismo; rs2242652; *TERT*.

## **Abstract**

**Introduction:** Breast cancer is the most common neoplasm in women around the world. There are several risk factors for this cancer: sex, age, body mass index (BMI), hormone therapy, family history, genetic mutations, among several others.

The vast majority of breast tumors are characterized as carcinomas and may originate from ducts or lobules. Immunohistochemistry is related to the expressions of the estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), as well as the expression of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cell proliferation or the absence of any expression from receptors on the tumor membrane.

The telomeres protect the chromosomes natural endings from suffering DNA loss. Telomerase is a ribonuclear protein complex (RNA and protein) that neutralizes telomeres' shortening.

Recurrent point mutations in the *TERT* telomerase promoter have been identified in several cancers, and the rs2242652 polymorphism is a single nucleotide change, and has been described as associated with breast cancer risk.

**Objective:** The objective of this study is to analyze the *TERT* rs2242652 polymorphism in breast cancer women and to test the correlation of such data with the prognosis and various clinical variables.

**Methods:** The study was conducted as an observational clinical study of women with breast cancer. A blood sample was collected from the patient and PCR was performed to extract the DNA and to analyze the telomerase polymorphisms in this population. To ensure a more descriptive analysis, the data was used in the construction of tables and graphs, that were then studied in a qualitative manner. The associations were analyzed through direct correlation tests and were followed by comparisons of categorization groups.

**Results and discussion:** Fifty-four women presented polymorphism of the telomerase hTERT gene rs2242652. They were divided into two groups according to the A or G allele that confer the GA / AA and GG gene variants.

It was found that the GA / AA group had a trend towards more aggressive tumors, presenting 33% triple negative and 22% of tumors with HER2 overexpression, different from the GG group: 19% triple negative and 10% HER2 overexpression. More aggressive T4 tumors, were more expressive in the GA / AA gene variant group representing 20% of the patients, whereas in the GG group they represented only 8%.

**Conclusion:** The data found in this study on the telomerase *TERT* gene polymorphism rs2242652 with breast cancer refers to a tendency found in tumors that have a more severe prognosis, to associate with the gene variant linked to the A allele of this gene, however a larger sample number is required for statistical confirmation.

**Keywords:** breast cancer; telomerase; polymorphism; rs2242652; *TERT*.



## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: A: Telossoma ou sheltrin; B: T-loop.....	15
Figura 2: Gel de agarose a 2% .....	20
Figura 3: Polimorfismos da telomerase em seus loccus.....	22
Figura 4: Imagem gráfica da leitura das bases nitrogenadas gênicas.....	23
Figura 5: Média da idade das pacientes por grupo de variante gênica.....	24
Figura 6: Variação numérica do tamanho tumoral.....	25
Figura 7: Distribuição em porcentagem da expressão de positividade de receptor de estrogênio (RE).....	27
Figura 8: Distribuição em porcentagem da expressão de positividade de receptor de progesterona (RP).....	27
Figura 9: Distribuição em porcentagem da superexpressão da proteína HER 2 .....	28
Figura 10: Porcentagem de expressão de Ki67 .....	28
Tabela 1: Distribuição em porcentagem do perfil imunohistoquímico: .....	24
Tabela 2: Distribuição em porcentagem do estadiamento em tamanho T.....	25
Tabela 3: Distribuição em porcentagem do estadiamento.....	26
Tabela 4: Distribuição em porcentagem do grau histológico .....	26
Tabela 5: Distribuição em porcentagem de características histológicas.....	27

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>9</b>
1.1. Câncer de mama.....	9
1.2 Rastreamento e diagnóstico .....	11
1.3 Telômero e telomerase .....	14
1.4 Marcadores genéticos e moleculares de prognóstico em câncer de mama .....	16
1.5 rs2242652.....	17
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
<b>3. Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1. Coleta de sangue.....	19
3.2. Extração de DNA.....	19
3.3. Análise do polimorfismo.....	19
3.4. Coleta de dados clínicos.....	21
3.5. Análises estatísticas.....	21
<b>4. Resultados .....</b>	<b>22</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>33</b>
<b>8. Apêndices .....</b>	<b>39</b>
Apêndice A: Termo de Consentimento HUB.....	39
Apêndice B: Termo de Consentimento IHBDF.....	40
Apêndice C: Voucher para coleta de sangue no Sabin.....	41
Apêndice D: Tabela com dados das 54 amostras que apresentaram polimorfismo rs2242652.....	42
<b>9. Anexos.....</b>	<b>43</b>
Anexo A: Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	43
Anexo B: .....	47

## **1. Introdução**

### **1.1 Câncer de mama**

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres de todo o mundo. No Estados Unidos é o segundo câncer mais relacionado com óbito na população feminina (1) no Brasil é o primeiro. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que em 2018 surgiram cerca de 59.700 novos casos, sendo responsável por 14.388 mortes (2).

As taxas de mortalidade por essa neoplasia vêm diminuindo desde a década de 1970 (3). Isso acontece provavelmente devido, pelo menos em parte, ao melhor rastreamento do câncer de mama e terapia adjuvante mais eficiente.

O risco de câncer de mama aumenta com o avançar de idade principalmente acima dos 50 anos (4). E ocorre 100 vezes mais em mulheres do que em homens. A maior taxa desse câncer está entre as mulheres brancas, embora continue sendo o câncer mais comum entre as mulheres de todos os grupos étnicos (5). Apesar disso, as mulheres negras apresentam-se mais comumente com doença localmente avançada (45% versus 35%). Muitas diferenças étnicas nas taxas de câncer de mama são atribuíveis a fatores associados ao estilo de vida e acesso a cuidados de saúde (6).

A obesidade está associada a um aumento global na morbi-mortalidade em todo o mundo. No entanto, o risco de câncer de mama associado ao índice de massa corporal (IMC) parece depender do status menopausal das mulheres (7). Essa associação entre um maior IMC e risco de câncer de mama na pós-menopausa pode ser explicada pelos altos níveis de estrogênio resultantes da conversão periférica de precursores de estrogênio (do tecido adiposo) em estrogênio através da enzima aromatase ou pela hiperinsulinemia (8).

A estatura mais elevada está associada a um maior risco de câncer de mama em mulheres na pré e pós-menopausa. Van den Brandt et al, mulheres com mais de 175 cm de altura tiveram 20% mais chances de desenvolver a doença do que aquelas com menos de 160 cm de altura (9). O mecanismo subjacente a essa associação é desconhecido, mas pode refletir a influência das exposições nutricionais durante a infância e a puberdade.

Os fatores hormonais são extremamente importantes na indução neoplásica mamária. Altos níveis de estrogênio endógeno aumentam o risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa e na pré-menopausa (10).

Mulheres com tecido mamário denso, geralmente definido como tecido glandular que compreendendo 75% da mama em mamografia (classe D), têm um risco quatro a cinco vezes maior de câncer de mama em comparação com mulheres de idade semelhante, com menor densidade (11). No entanto, isso não reflete maior mortalidade pela doença (12).

O uso isolado de estrogênio exógeno parece não aumentar o risco de câncer de mama porém, em conjunto com a progesterona pode causar um aumento na divisão celular no tecido mamário, levando a um acúmulo de erros de DNA que podem promover uma maior proliferação de células malignas (13). Além disso, sabemos que a atividade proliferativa da mama em mulheres na pré-menopausa é mais alta durante a fase lútea do ciclo menstrual,

uma época de aumento da secreção de progesterona (14). E mulheres tratadas com terapia combinada de estrogênio e progesterona têm aumento na densidade mamográfica e maior proliferação celular em biópsias benignas da mama (15).

A idade precoce da menarca está associada ao aumento do risco também. Mulheres com menarca após os 15 anos de idade tiveram maior probabilidade de desenvolver câncer de mama positivo para receptor de estrogênio (RE) / receptor de progesterona (RP) em comparação com mulheres que tiveram o primeiro ciclo menstrual antes dos 13 anos de idade (16).

O número de gestações é inversamente proporcional ao risco para desenvolvimento do câncer de mama, sendo assim, as nulíparas apresentam o risco mais elevado. Mulheres que engravidam mais velhas também têm um risco aumentado (17). Sabe-se ainda que ocorre uma diferenciação celular completa na glândula mamária durante e após a gravidez, com a formação de lóbulos tipo 4, que protege a mama por aumentar o número de lóbulos bem diferenciados (18).

A história pessoal de carcinoma ductal in situ (CDIS) ou câncer de mama invasivo prévios aumenta o risco de desenvolver tumor invasivo na mama contralateral. Um estudo de 2010 usando dados do SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) que incluiu quase 340.000 mulheres com câncer de mama primário demonstrou que a incidência de câncer de mama invasivo contralateral foi de 4% durante um acompanhamento médio de 7,5 anos (19).

A história familiar de câncer de mama também é um fator de risco importante e é afetado pelo número de parentes de primeiro grau do sexo feminino com câncer. Em uma análise usando dados de mais de 50.000 mulheres com a doença e 100.000 controles, o risco de câncer de mama aumentou quase o dobro se uma mulher teve um parente de primeiro grau afetado e o triplo se ela tivesse dois parentes de primeiro grau afetados (20).

As mutações genéticas herdadas que predispõem ao câncer de mama são raras. Apenas 5 – 10% de todos os cânceres de mama são diretamente atribuíveis à herança de um gene de suscetibilidade ao câncer de mama, como BRCA1, BRCA2, p53, ATM e PTEN (20).

Fatores de risco relacionados ao estilo de vida também devem ser destacados. O tabagismo está associado ao aumento do risco (21), bem como o consumo de álcool, que mesmo em doses baixas mostrou-se um fator de preocupação (22).

A exposição à radiação ionizante do tórax em idade jovem, como ocorre com o tratamento do linfoma de Hodgkin ou em sobreviventes de bomba atômica ou acidentes em usinas nucleares também está associada a um risco aumentado de câncer de mama. As idades mais vulneráveis parecem estar entre 10 e 14 anos (23). Essas pacientes devem, inclusive, iniciar o rastreamento mais precocemente.

Como fatores protetores destacam-se o aleitamento materno cuja magnitude depende da duração da amamentação (24), e a atividade física que oferece proteção modesta contra o câncer de mama, particularmente em mulheres pós-menopausadas (25).

## 1.2 Rastreamento e diagnóstico

O diagnóstico do câncer de mama pode ser feito por detecção de alterações clínicas ou imaginológicas. Toda mulher acima de 40 anos deve fazer anualmente a mamografia. Esse é o exame de rastreamento preconizado para diagnóstico precoce do tumor de mama (26).

A descrição das lesões encontradas em mamografia foi padronizada pelo sistema de classificação Bi-Rads. Sendo 0 a categoria de lesões inconclusivas, 1 – negativa para malignidade, 2 – achados benignos, 3 – achados possivelmente benignos com probabilidade menor que 2% de malignidade, 4 – achados que dependem de amostragem histopatológica para diagnóstico com probabilidade de 2 a 95% de chance de malignidade, 5 – achados altamente sugestivos de malignidade com probabilidade maior que 95% e 6 – quando se faz mamografia já tendo conhecimento por biópsia prévia que existe uma lesão maligna naquela mama (27).

Quando a mamografia não é conclusiva, podem ser feitos métodos complementares. Um deles é a ultrassonografia de mamas que é capaz de determinar se a lesão de densidade aumentada em mamografia é sólida ou cística além de aumentar a precisão na medida da lesão (28). Além de ser um bom exame para avaliação de linfonodos axilares.

Outro método de imagem complementar é a ressonância magnética que tem uma sensibilidade maior que a mamografia, porém uma especificidade menor (29), além de fazer uma avaliação dinâmica da lesão com a injeção de contraste gadolínio.

O exame físico feito pelo profissional de saúde ou até mesmo o auto-exame das mamas são aliados importantes no diagnóstico do câncer de mama. Mas apenas 15% das lesões palpáveis não são detectadas mamograficamente (30).

Após a suspeita de câncer de mama por exame físico e/ou imagem é necessário a confirmação histopatológica. Os métodos de biópsia de mama incluem biópsia de punção cutânea (quando existe lesão visível em pele), aspiração por agulha fina (PAAF), biópsia por agulha grossa e biópsia cirúrgica. Em geral, a biópsia percutânea deve ser realizada como abordagem de primeira linha, seguida de cirurgia definitiva.

A PAAF permite uma análise citológica. Pode ser feita com a palpação da lesão ou guiada por ultrassom, e seu resultado é importante para diferenciar se as células coletadas sugerem malignidade ou não (31).

A Punção por agulha grossa acontece para que se possa retirar fragmentos do tumor para uma análise histopatológica. Ela pode ser feita com agulha cortante ou por sistema à vácuo. A agulha deve ser introduzida após anestesia local, obedecendo o trajeto mais próximo da pele até o tumor (32).

A biópsia cirúrgica só deve ser usada se os outros métodos não puderem ser aplicados ou foram inconclusivos. Ela pode ser incisional, retirando apenas uma pequena parte do tumor ou excisional, retirando o tumor por completo (33).

Histopatologicamente, a grande maioria dos tumores de mama são de origem epitelial, porém raras vezes algumas pacientes desenvolvem tumor no tecido conjuntivo

mamário, como por exemplo o sarcoma que representa menos de 1% de todas as patologias malignas da mama (34).

Os tumores epiteliais são caracterizados como carcinomas e podem ter origem em ductos ou lóbulos. Podem ser *in situ*, quando não invadem a membrana basal ou invasivos.

Os carcinomas mamários são divididos de acordo com suas especificidades histológicas e possuem incidências populacionais assim descritas: Carcinoma ductal infiltrante (CDI) - 76%; Carcinoma lobular infiltrante (CLI) – 8%; Carcinoma mistos (ductal / lobular) – 7%; mucinoso – 2,4%; tubular – 1,5%; medular – 1,2%; papilar – 1%; mataplásico e micropapilar < 5% (35, 36).

Complementando a análise histopatológica, se faz necessária a análise imunohistoquímica. Estudos de expressão gênica identificaram vários subtipos distintos de câncer de mama que diferem acentuadamente no prognóstico e nos alvos terapêuticos que expressam (37). São conjuntos de genes relacionados à expressão do receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP); expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), proliferação celular ou ausência de expressão de qualquer receptor em membrana tumoral.

O câncer de mama tem origem por mutação em células da unidade ducto-tubular da mama, em células tronco tumorigênicas que estão nos lóbulos tipo 1 indiferenciados (38). Essa célula por sua vez pode tomar dois caminhos: Ou evolui para linhagem de células epiteliais luminais, que expressam receptores de estrogênio, ou evolui para células basais mioepiteliais, formando os tumores basalóides (39).

Esse processo é complexo e sequencial podendo demorar anos e ocorre em três etapas: Iniciação, promoção e progressão (40).

A iniciação, que depende da lesão do DNA da célula matriz gerando o clone modificado (41). Pode acontecer por translocação, quando segmentos cromossômicos ou genes se inserem em outra parte do cromossomo segmentado; amplificação, que são múltiplas cópias de alelos promovendo mais transcrição; deleção, que é a perda completa ou parcial de um gene ou segmento cromossômico ou mutação pontual, que é a alteração no pareamento de bases. Estima-se que a mutação ocorra normalmente a cada 1.000.000 divisões celulares, porém quando já há instabilidade genômica por inativação de vias de reparo do DNA lesado, como o p53 ou BRCA 1 ou BRCA 2, essa taxa aumenta consideravelmente.

A via das proteínas codificadas pelo p53 não-mutado é importante para evitar a evolução de células com DNA lesado. Ela inibe o ciclo celular na fase G2, regulando apoptose e impedindo angiogênese. Quando o p53 apresenta mutação esse sistema fica comprometido (42).

Os cânceres de mama podem ser esporádicos (90 – 95%) ou hereditários (5-10%) e acontecem por perda de ação dos genes supressores ou ativação dos proto-oncogenes. Nos tumores ocasionais o gene supressor mais afetado é o CDH1 e nos hereditários são o BRCA 1 BRCA 2.

Nos cânceres hereditários a primeira mutação é germinativa (ocorre em todas as células do corpo ao nascimento) e a segunda é somática (só nas células tumorais). Nos cânceres esporádicos, as duas são somáticas e verificadas apenas nas células do tumor.

A etapa da promoção ocorre quando as células geneticamente modificadas passam a se multiplicar estimuladas por fatores promotores, como por exemplo os fatores esteroides (43).

A progressão acontece quando as células neoplásicas já se desenvolveram a ponto de formar um tumor inicial e invadiram a membrana basal subepitelial atingindo o estroma subjacente.

A principal via de disseminação de células neoplásicas de mama é a linfática. Uma vez dentro dos canalículos linfáticos os êmbolos neoplásicos são transportados até o linfonodo sentinela e a partir desse, pode atingir os outros linfonodos, podendo atingir o ducto torácico à esquerda ou o ducto linfático direito, atingindo átrio direito, pulmões e podendo metastizar par o corpo inteiro.

A metástase à distância compreende as etapas de embolização intravascular, a retenção em determinados órgãos, o extravasamento capilar seguido de infiltração e reprodução em sítio secundário (44).

A maioria dos casos de câncer de mama hereditário está relacionada à síndrome mama-ovário, que tem como principal genes mutados o BRCA 1 e o BRCA 2, porém esses não são os únicos genes descritos que favorecem o aparecimento do câncer de mama.

Diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN), do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica e da Sociedade Nacional de Conselheiros Genéticos fornecem critérios detalhados para identificar candidatos para aconselhamento genético e possíveis testes para o câncer de mama e/ou ovário hereditário (45, 46):

Câncer de mama feminino diagnosticado antes de 50 anos; câncer de mama triplo-negativo (TNBC) diagnosticou antes de 60 anos; dois ou mais cânceres de mama primários; câncer de ovário ou de Falópio invasivo ou câncer peritoneal primário; câncer de mama masculino; quaisquer tipos de câncer associados a síndrome mama-ovário, independentemente da idade no diagnóstico, e de ascendência judaica de Ashkenazi (centro ou leste europeu); câncer de mama e um parente com câncer de mama diagnosticado abaixo dos 50 anos ou câncer de ovário, ou dois parentes com câncer de mama, próstata e / ou pancreático, diagnosticados em qualquer idade; variante patogênica de BRCA identificada a partir da análise genômica do tumor, independentemente do tipo de tumor; pacientes incluem aqueles com câncer de mama metastático e câncer de pâncreas, independentemente da história familiar (47); pacientes sem história pessoal de câncer com uma variante patogênica no BRCA1 ou BRCA2 em um parente de primeiro grau biológico, pelo menos dois indivíduos com primárias de câncer de mama do mesmo lado da família com pelo menos um diagnosticado antes de 50 anos, um parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama antes de 45 anos ou história familiar de três ou mais cânceres relacionados a síndromes de câncer hereditário.

Outras síndromes hereditárias são: Síndrome de Li-Fraumeni que está associada a variantes patogênicas germinativas no gene da proteína p53 tumoral (TP53), e os portadores têm maior risco de desenvolver múltiplos cânceres primários na infância ou na idade adulta jovem (48). As neoplasias associadas, além do câncer de mama, incluem sarcomas, câncer cerebral, leucemias, meduloblastoma e câncer adrenocortical.

A síndrome de Peutz-Jeghers é rara e está associada a variantes patogênicas no gene da serina-treonina quinase 11 (STK11, também chamado de LKB1) (49). Síndrome de Cowden é a do gene supressor de tumores homólogos à fosfatase e à tensina (PTEN). Portadores têm riscos elevados para câncer de mama, endométrio e tireoide folicular (50).

A síndrome hereditária do câncer gástrico difuso causada pela alteração do gene CDH1, é caracterizada por uma suscetibilidade ao câncer gástrico difuso emanel de sinete e também estão associadas ao desenvolvimento de câncer de mama lobular em mulheres, com um risco cumulativo ao longo da vida estimado em 50% a 60% (51).

A mutação PALB2 está relacionada ao câncer de mama pois ele codifica uma proteína que interagem com o BRCA2 o que é crucial para as principais funções de resposta ao dano ao DNA, bem como para a atividade de supressão tumoral (52).

Os tumores hereditários geralmente conferem perfis histopatológicos e imunohistoquímicos mais agressivos, além de acometerem mulheres mais jovens. Entender geneticamente o câncer de mama auxilia na prevenção nesses casos específicos.

### **1.3 Telômero e telomerase**

Os telômeros que são estruturas especializadas no final dos cromossomos, compostas de ácido nucléico e componentes proteicos que mantêm a integridade das extremidades dos cromossomos, protegendo as extremidades naturais dos cromossomos da perda de DNA (53). São organizadas em sequências repetitivas de TTAGGG. Em humanos, o comprimento da faixa de telômeros de fita dupla (ds) é de cerca de 9 a 15 kb.

A cada divisão celular, 50 a 100 pares de bases deste DNA telomérico são removidos devido a replicação incompleta das extremidades 3'. Quando os telômeros atingem um limiar criticamente curto, a célula não consegue mais se dividir adequadamente e sofre apoptose ou senescência (54). Na maioria das células somáticas, o encurtamento do comprimento dos telômeros é uma consequência normal do envelhecimento. Porém a enzima telomerase é capaz de reestabelecer esse telômero permitindo que essa célula se perpetue por mais tempo (55).

Essa telomerase é um complexo proteico ribonuclear (RNA e proteínas) que neutraliza o encurtamento dos telômeros pela adição de DNA nas extremidades dos cromossomos. É um complexo de seis proteínas conhecido como o telossoma, ou shelterin e funcionam como uma plataforma para manutenção e proteção do cromossomo.

Esse complexo proteico possui ligados diretamente ao telômero o TRF1 (TTAGGG repeat binding factor 1), o TRF2 (TTAGGG repeat binding factor 2) e o POT1 (Protection Of Telomeres1). As outras três proteínas interagem com os telômeros através de interações



proteína-proteína: TIN2 (Proteína Nuclear Interativa de TRF 2) liga as proteínas TRF1 e TRF2 e também interage com TPP1 (Tripeptidil-peptidase 1), que ao mesmo tempo se liga a POT1. Finalmente, RAP1 interage exclusivamente com TRF2 (56).

O TRF1 e TRF2 regulam negativamente o comprimento dos telômeros. A superexpressão de TRF1 ou TRF2 in vivo induz um declínio gradual no comprimento dos telômeros. A formação da alça T foi proposta para envolver tanto o TRF1 quanto o TRF2. O mecanismo baseado em T-loop para proteção de telômeros poderia prever que tanto o TRF1 quanto o TRF2 são cruciais para a homeostase do comprimento dos telômeros humanos (57).

A função TRF1 é regulada por TIN2 e duas proteínas homólogas, TANK1 e TANK2. A ligação do TRF1 às seqüências de repetições teloméricas é aprimorada pelo TIN2. Uma mutação na proteína TIN2 leva ao alongamento dos telômeros, sugerindo que o TIN2 é um regulador negativo do comprimento dos telômeros (58).

Quando o TRF2 é inibido, 15% dos telômeros são fundidos e o DNA telomérico persiste no local da fusão, demonstrando que a repetição do TTAGGG não é suficiente para a integridade dos telômeros. Assim, o TRF2 protege os telômeros críticos de fusão fim-a-fim e retarda a entrada da senescência. Parece que o status de proteção dos telômeros, além da perda dos telômeros, é importante para a entrada na senescência (59).

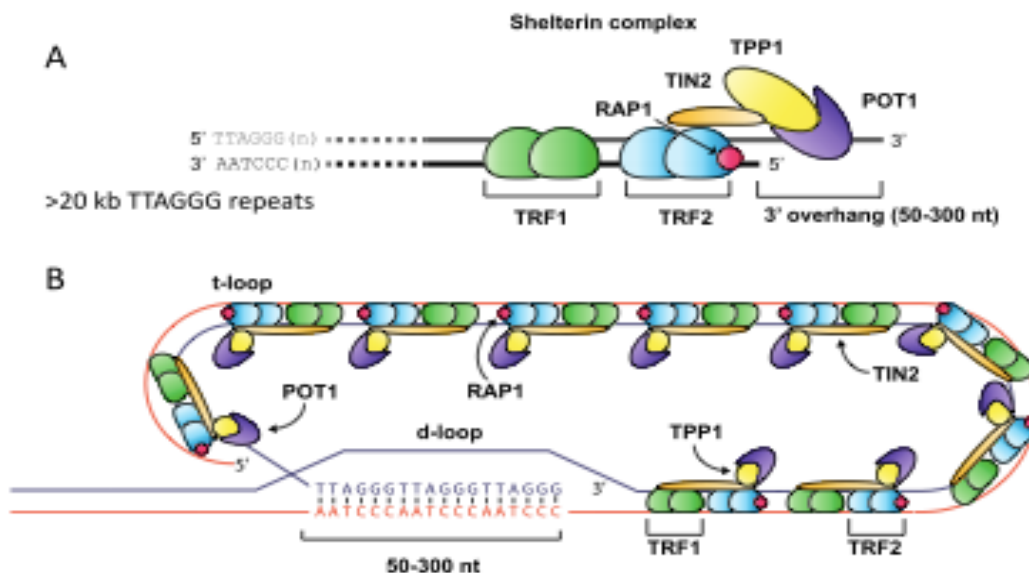


Figura 1: A: Telossoma ou sheltrín; B: T-loop  
Int. J. Mol.Sci. 2018,19,482 (60)

A telomerase funcional é composta pela proteína *TERT* (do termo em inglês “telomerase reverse transcriptase”, ou transcriptase reversa da telomerase) e pelo componente de RNA de telomerase (*TERC*) que atua como um molde para a síntese de DNA.

O produto do gene *TERT* contém três domínios estruturais distintos: o domínio de ligação ao RNA (TRBD), o domínio da transcriptase reversa e a extensão carboxi-terminal (CTE), que representa o domínio putativo do polegar de *TERT* (61).

A expressão do *hTERT* (subunidade catalítica da telomerase humana) é capaz de restaurar o comprimento dos telômeros, evitando o processo de senescência e tornando a célula imortalizada. Esse processo é vital para a manutenção de células replicantes no tumor, já que mantém a integridade dos telômeros e capacita tais células a dividirem-se continuamente (61,62). A imortalização celular permite que os tumores cresçam e dá tempo às células pré-cancerosas ou cancerosas para acumularem mutações adicionais. Na maioria dos casos, se a telomerase for bloqueada nas células cancerosas, seus telômeros encurtarão de novo sempre que se dividirem, levando a apoptose ou à crise (63). Portanto, a telomerase caracteriza-se como uma enzima chave no processo da carcinogênese, e potencial marcador molecular para prognóstico de diversos tipos de câncer.

A atividade da telomerase é ausente na maioria dos tecidos somáticos humanos normais mas é frequentemente detectável em quase todos os tipos de tumores, reforçando a importância da telomerase no desenvolvimento de câncer (64).

Em 85-90% dos tumores, a telomerase está envolvida no processo seletivo da tumorigênese (65). A telomerase ativada produz um equilíbrio dinâmico entre o alongamento e o encurtamento e tende a resultar no comprimento homogêneo dos telômeros. A estabilização resultante do comprimento do telômero promove a estabilidade dos cromossomos.

Mutações pontuais recorrentes no promotor da proteína TERT foram identificadas em uma série de cânceres, com uma frequência geral de cerca de 19%, embora alguns cânceres apresentem uma incidência maior (66). Múltiplas famílias de fatores de transcrição têm sítios de ligação no promotor TERT e vários estudos sugerem que o ambiente da cromatina desempenha um papel na reativação da telomerase (67).

Considera-se que a instabilidade do genoma conduzida por telômeros está intimamente ligada à oncogênese, promovendo a diversidade clonal e a evolução do genoma através de ganhos ou perdas no número de cópias, reorganização do genoma e efeitos de remodelação da cromatina. Investigar as consequências das fusões de telômeros na arquitetura do genoma, portanto, fornece uma visão dos mecanismos que governam a progressão do câncer (68). Assim, o comprimento dos telômeros poderia ser usado como marcador prognóstico para determinar o desfecho do câncer.

#### **1.4 Marcadores genéticos e moleculares de prognóstico em câncer de mama**

Um pior prognóstico clínico foi observado em pacientes com comprimentos de telômero de leucócitos mais longos para um número de cânceres: no câncer de próstata, o comprimento dos telômeros longos foi considerado um fator negativo independente para a sobrevida livre de metástases e morte específico (69). Achados semelhantes também foram

observados em pacientes com carcinoma de mama, onde pacientes com longo comprimento de telômeros de leucócitos apresentaram um resultado pior (70).

Embora se estima que até 80% da variação do comprimento dos telômeros seja devido a fatores hereditários, estudos de associação sobre polimorfismo de nucleotídeo único de TERT e diferenças no comprimento dos telômeros de leucócitos têm sido, até o momento, inconclusivos (71).

O câncer de mama é bastante estudado e vários polimorfismos de nucleotídeo único em TERT, TEP1, TERF2 e TNKS estão associados a essa patologia, principalmente com relação à expressão de RE e RP pelo tumor, além da relação com tumores em pacientes com mutação genética, principalmente de BRCA 1 e BRCA 2.

Cinco polimorfismos de nucleotídeo único em TERT: rs4246742, rs10069690, rs2242652, rs2736100 e rs2853676, foram associados ao risco global de câncer de mama, embora a maioria das associações tenha sido modesta. (72).

### **1.5 rs2242652**

O polimorfismo rs2242652 é uma alteração de nucleotídeo único localizado na posição 5p15.33 do gene TERT da polimerase entre os íntrons 1,227,693 – 1,361,969 (73).

Esse polimorfismo foi descrito em algumas publicações relacionado ao aumento da chance de algumas neoplasias malignas, como câncer colorretal, próstata, pulmão e mama, porém como fator de diminuição do risco de mieloma múltiplo (74).

Essa mesma alteração também foi descrita associada ao risco de câncer de mama em pacientes portadores de mutação BRCA1 (73). O que desperta ainda mais a busca por polimorfismos desse gene relacionados com o câncer de mama.

Alguns polimorfismos de nucleotídeo único da hTERT estão associados a outras doenças que não apenas o câncer. O polimorfismo que estudamos rs2242652 está relacionado com doenças como hepatite B crônica em população chinesa. Acredita-se que essa associação se faz pois essa alteração pode ser responsável por alterar a regulação da atividade imunológica do hospedeiro. (75).

Há estudos em que os autores levantam a hipótese de que variantes gênicas dos genes TERC e TERT poderiam diminuir o comprimento dos telômeros de leucócitos que aumentam a probabilidade de acidente vascular isquêmico. Assim, as variantes GA e AA para polimorfismo rs2242652 também estão relacionados com esse fato. (76).

O estudo de polimorfismos como esse podem demonstrar que alterações na telomerase interferem no organismo como um todo, pois modificam o tempo de vida natural da célula. Por isso é tão importante reconhecer essas alterações nas pacientes com câncer de mama, pois apontando erros cromossômicos poderemos no futuro identificar possíveis pacientes susceptíveis ao câncer de mama ou até mesmo aquelas com piores prognósticos, buscando sempre meios para melhoria de vida dessas mulheres.

## **2. Objetivos**

**2.1 Objetivo geral:** Analisar o polimorfismo rs2242652 do gene hTERT em mulheres com câncer de mama.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- a) Descrever a população estudada quanto aos aspectos clínicos relevantes;
- b) Identificar a presença do polimorfismo rs2242652 na população estudada;
- c) Descrever as frequências gênica e alélica para o polimorfismo estudado
- d) Estudar a associação do polimorfismo com características clinicamente relevantes na determinação de prognóstico;

### **3. Métodos**

O trabalho foi conduzido como estudo clínico observacional e a população do estudo foi constituída por mulheres com câncer de mama que aceitaram participar da pesquisa atendidas no período de março de 2015 a novembro de 2018 no Hospital Universitário de Brasília (HUB), no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO) e no Instituto Hospital de Base do Distrito Federal (IHB- DF).

O projeto de estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisas em Ciências da Saúde (FEPECS) sob o número CAAE: 81655317.0.0000.5553 (Anexo A) e a proposta ainda integra o projeto “Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/FS-UnB) na área temática “Genética humana” sob número CAAE: 30711114.3.0000.0030 (Anexo B).

Foram incluídas mulheres que tiveram diagnóstico de câncer de mama em algum momento de suas vidas com histopatológico confirmado, independente da idade. Foram excluídas as mulheres que não tinham seus dados clínicos anotados em prontuário, ou amostras inválidas para análise.

#### **3.1 Coleta de Sangue**

Durante a consulta oncológica, a paciente era convidada a participar do estudo. As que aceitavam, assinavam o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (Apêndices A e B) e recebiam o voucher para coleta de sangue (Apêndice C) ou tinham suas amostras coletadas pelos pesquisadores no momento da consulta.

Foram coletados 4 mL de sangue periférico das pacientes, em tubo EDTA específico para biologia molecular, sem custos para a paciente. O material era levado para o laboratório da Universidade de Brasília, campus Ceilândia e processado para extração do DNA.

#### **3.2 Extração do DNA**

Foi executada a extração padrão por desidratação e precipitação com uma solução saturada de NaCl, segundo metodologia de Miller, Dykes & Polesky (77). Após extração, o DNA foi diluído em água ultrapura (grau cromatográfico). A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop One (Thermo Scientific, Madison, USA). As amostras de DNA foram aliquotadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 Análise de Polimorfismo

A abordagem metodológica usada para o estudo do polimorfismo foi a técnica sequenciamento de fragmento amplificado. O procedimento de PCR (amplificação) foi realizada sob condições padrão em uma mistura reacional de 30  $\mu$ l, contendo: 20 nanogramas de DNA extraído; 0,6  $\mu$ M de cada iniciador; 0,2 mM de desoxirribonucleótidos fosfatados; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,03U de polimerase Ampli Taq (Uniscience Corporation, Miami, USA, 5U/ $\mu$ l); e tampão adequado (fornecido pelo fabricante). As condições de reação foram as seguintes: 95°C durante 12 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30s, 58.5°C durante 30s, 72°C durante 30s; e 72°C durante 5 min.

Os fragmentos de DNA, em seguida, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para verificação de tamanho da banda, condição de controle negativo e presença de banda única (Figura 2).

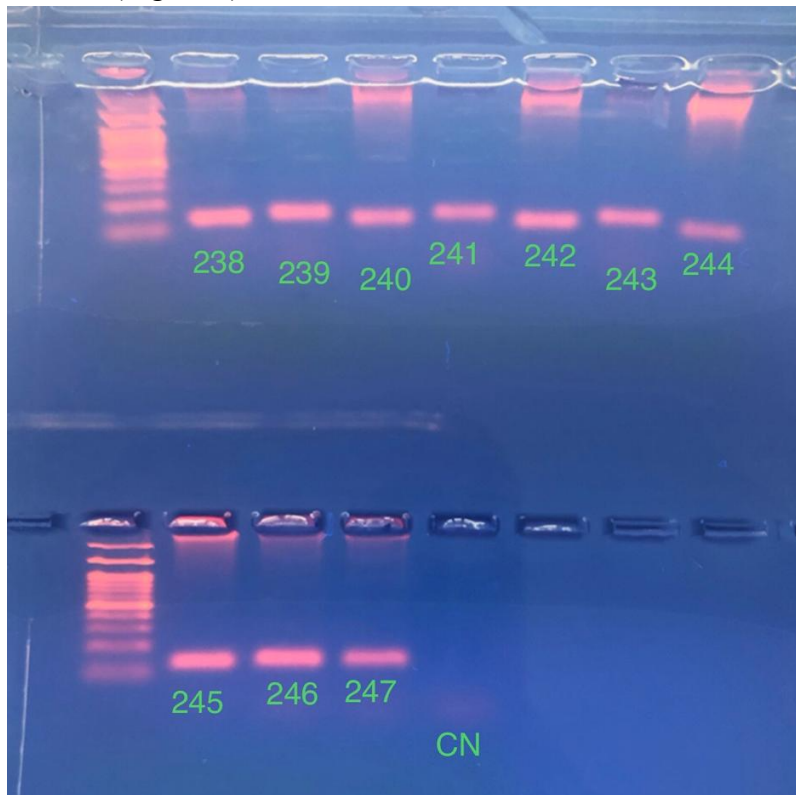


Figura 2: Gel de agarose a 2% com marcador pares de base (25kb) mostrando a banda de 160 pb de 5 amostras de pacientes e controle negativo que foram submetidos a PCR

Para a realização do sequenciamento os produtos de PCR foram novamente quantificados, padronizados para 60 nanogramas e submetidos a um processo de secagem em termobloco a 70°C por 1 hora. As amostras foram enviadas pelos correios ao ACTGene Análises Moleculares Ltda (Alvorada, Rio Grande do Sul), empresa responsável pelo sequenciamento das amostras. O equipamento utilizado pela empresa foi o sequenciador AB

3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados com 2,5 pmol do primer F (rs2736100 - F: 5'-ATG CGA CAG TTC GTG GCT CA-3') e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Byosystems) com um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador (LGC XP Cycler) nas seguintes condições: 96°C durante 3 minutos; 25 ciclos de 96°C durante 10s, 55°C durante 5s e 60°C durante 4m. Em seguida, as amostras foram purificadas (isopropanol 75%), lavadas (etanol 60%), diluídas em formamida Hi-Fi (Applies Byosystems), desnaturadas a 95°C por 5 min, resfriadas em gelo e eletroinjetadas no sequenciador. Após o sequenciamento, os resultados obtidos foram analisados utilizando o software Chromas Lite (versão 2.01, Technelysium Pty Ltd.) e com a ferramenta PHPH disponível online (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Essas ferramentas foram utilizadas para averiguar a qualidade do sequenciamento e confirmar mutações em regiões de interesse. Os alinhamentos foram realizados utilizando o BLAST (78).

### **3.4 Coleta de dados clínicos**

Os dados clínicos foram coletados através dos prontuários eletrônicos das pacientes disponíveis no HUB, CETTRO e IHB-DF e tabelados em planilha de Excel. As variáveis coletadas foram: registro do paciente, ano de nascimento, peso, altura, idade ao diagnóstico de câncer de mama, informações imuno-histoquímicas e anatomo patológico pré-operatórias e da peça do tumor: Receptores hormonais, Ki67, HER2, tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos, estadiamento, classificação histológica e grau nuclear tumoral.

### **3.5 Análise estatística**

Para análise descritiva, os dados planilhados foram utilizados na construção de tabelas e gráficos que foram qualitativamente estudados.

As associações foram analisadas por testes de correlação direta numa primeira abordagem, seguida de comparação de grupos compostos por categorização. No caso das variáveis quantitativas, pontos de corte foram definidos para a composição dos grupos, conforme informado na apresentação dos resultados.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes t ou ANOVA para os dados com distribuição normal e Mann Whitney ou Kruskal-Wallis para dados com distribuição não normal. O teste do  $\chi^2$  foi empregado para o estudo de associações de variáveis categóricas ou categorizadas. Para todos os testes estatísticos o valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 7.02 para todas as análises.

#### 4. Resultados

Foram selecionadas para o estudo 116 mulheres para o estudo atendidas no HUB, CETRO e IHBDF. Dessas, apenas 72 pacientes continham dados clínicos e patológicos descritos em prontuários suficientes para análise, além de terem amostras apropriadas para PCR e extração do DNA (Apêndice D). Das 72 amostras, 54 apresentaram resultados de sequenciamento com qualidade suficiente para permitir a determinação da variante gênica do polimorfismo estudado de forma segura. Esse polimorfismo foi descrito entre o locus 1.279.910 e o 1.279.920 do cromossomo, conforme a figura 3.

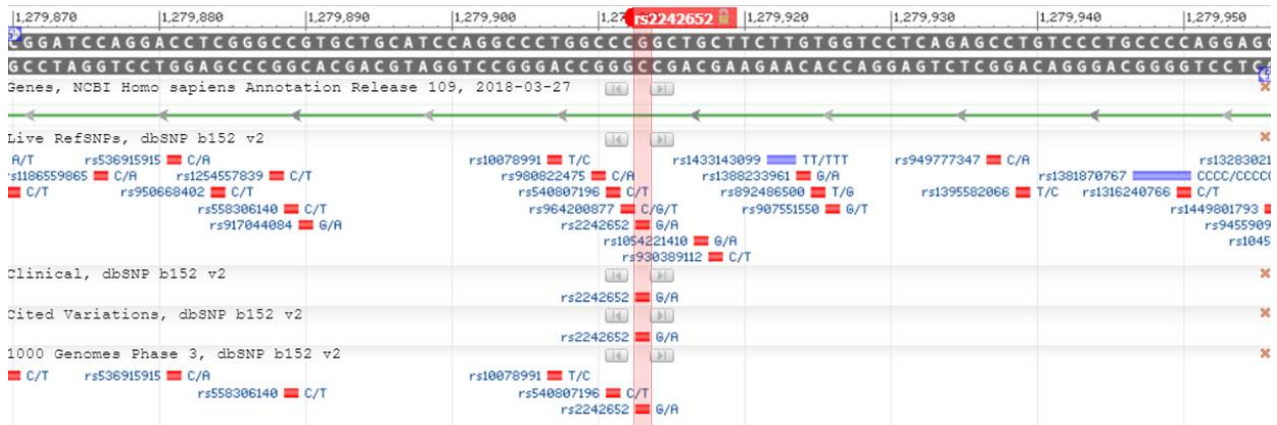


Figura 3: Polimorfismos do gene hTERT em seus locus. O polimorfismo rs2242652 destacado em vermelho possibilita as seguintes variantes gênicas: GG; GA; AA

Os eletroferogramas da região amplificada do gene da telomerase de cada paciente foram analisados para determinação da sequência de interesse e respectiva variante, permitindo a distinção da ocorrência da troca G>A em homocigose e heterocigose, como demonstrado na figura 4.



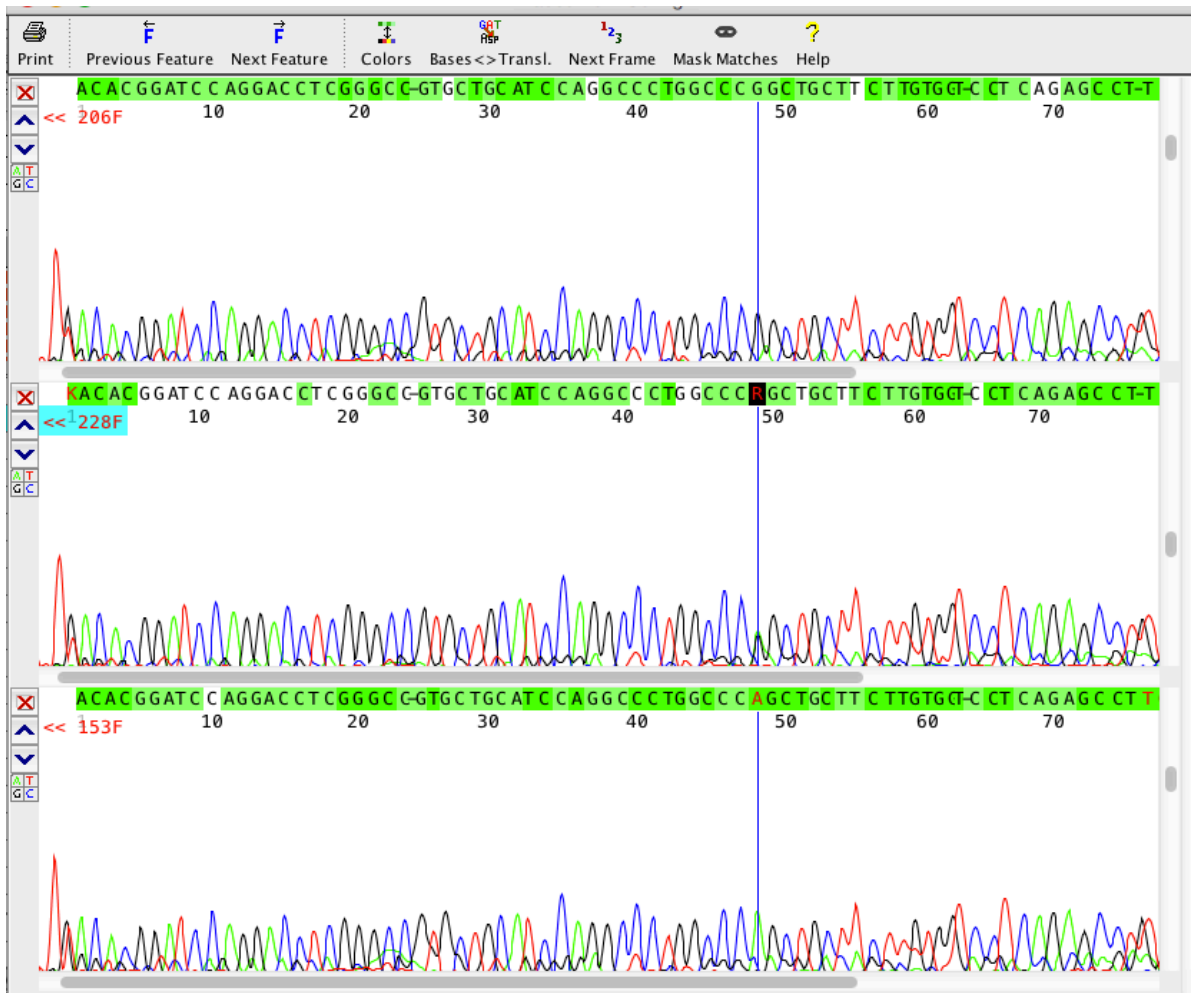


Figura 4: Fragmento dos eletroferogramas contendo a região do polimorfismo estudado. Acima uma paciente homocigoto com a forma mais frequente do gene, no centro uma paciente heterocigoto, em que se observam os picos para Guanina e Adenina simultaneamente (linha) e abaixo uma paciente homocigoto para a troca G>A (variante AA).

Após a análise, verificou-se a presença do polimorfismo de interesse na amostra estudada. Este é o primeiro trabalho que demonstra tal polimorfismo em população brasileira. As frequências alélicas foram de 90% para o alelo G e 10% para o alelo A, levando às frequências gênicas de 81% para a variante majoritária GG e 17% e 1% para as variantes GA e AA, respectivamente, sendo essa última descrita em apenas uma paciente. A frequência relativamente baixa das variantes minoritárias comprometeu a análise estatística pois determinou um grupo com alelos A com baixo número amostral, ainda assim, algumas análises foram possíveis.

No grupo estudado, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 53 anos nas pacientes com o alelo A (variantes gênicas GA e AA) e 50 anos nas pacientes com variante gênica GG, sendo a paciente mais nova com 28 anos e a mais idosa com 78 anos (Figura 5). Segundo o INCA o câncer de mama é raro antes dos 35 anos e a partir dessa idade a incidência da doença cresce, principalmente após os 50 (2).

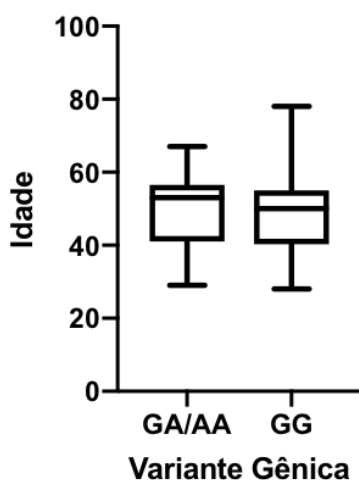


Figura 5: Mediana da idade das pacientes por grupo de variante gênica

Em relação às características clínicas, o primeiro parâmetro estudado foi o perfil imunohistoquímico dessas pacientes. Encontramos que em ambos os grupos o perfil mais prevalente foi o Luminal B (34% no grupo GA/AA e 45% no grupo GG), é perceptível que o grupo GA/AA teve uma tendência à tumores mais agressivos, apresentando 33% de triplo negativo e 22% de tumor com superexpressão de HER 2 (conferindo um total de 55% das pacientes) diferente do grupo GG, em que esses tumores representaram apenas 29% do total, sendo 19% triplo negativos e 10% com superexpressão de HER2 (tabela 1).

	GA/AA (%)	GG (%)
<b>Luminal A</b>	11	26
<b>Luminal B</b>	34	45
<b>HER 2</b>	22	10
<b>Triplo negativo</b>	33	19

Tabela 1: Distribuição em porcentagem do perfil imunohistoquímico nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG.

Em ambos os grupos o estadiamento T2, que compreende tumores maiores que 2 cm até 5 cm, foi o mais prevalente, sendo 40% das pacientes do grupo GA/AA e 54% das pacientes do grupo GG. Uma característica que chama atenção é que tumores T4, ou seja,

tumores mais agressivos foram mais expressivos no grupo GA/AA representando 20% das pacientes, enquanto no grupo GG eram apenas 8% (Tabela 2).

	GA/AA (%)	GG (%)
<b>T1</b>	20	24
<b>T2</b>	40	54
<b>T3</b>	20	14
<b>T4</b>	20	8

Tabela 2: Distribuição em porcentagem do estadiamento em tamanho T nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG. Sendo T1 tumores até 2 cm, T2 tumores maiores que 2 cm até 5 cm, T3 tumores maior que 5 cm, T4 tumores que invadem parede torácica e/ou pele ou infalmatório.

Quando avaliado em centímetros, a mediana do tamanho tumoral é maior no grupo GA/AA como mostra a figura 6.

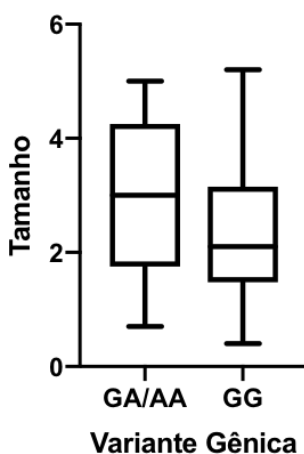


Figura 6: Variação numérica do tamanho tumoral

Quando analisamos conjuntamente o tamanho tumoral (T), com o status linfonodal (N), se há câncer em cadeias ganglionares, e se a presença ou não de metástases sistêmicas (M), temos o estadiamento do câncer de mama. Para todas as variantes o estadiamento mais prevalente foi o IIA, mas seguindo o que já foi descrito, é relevante o fato de no grupo da variante GA/AA ser descrito 30% das pacientes com tumor em estadiamento IIIB, o que não é correspondente no grupo GG que tem apenas 9% das pacientes com essa agressividade tumoral (Tabela 3).

Na avaliação da diferença na frequência de tumores em estadiamento III B, a análise estatística mostrou p 0,1.

	<b>GA/AA (%)</b>	<b>GG (%)</b>
<b>Estadiamento I</b>	20	11
<b>Estadiamento IIA</b>	30	46
<b>Estadiamento IIB</b>	20	26
<b>Estadiamento IIIA</b>	0	8
<b>Estadiamento IIIB</b>	30	9

Tabela 3: Distribuição em porcentagem do estadiamento nas pacientes as variantes gênicas GA/AA e GG. Estádio I (T0 a 1 N0 ou mic M0), estágio IIA (T1 N1 M0 ou T2 N0 M0), estágio IIB (T2 N1 M0 ou T3 N0 M0), estágio IIIA (T0 a 2 N2 M0 ou T3 N1 a 2 M0), estágio IIIB (T4 N0 a 2 M0), estágio IIIC (qualquer T N3 M0) e estágio IV (qualquer T qualquer N M1).

A análise do grau histológico mostra que 62% das mulheres com a variante gênica GA/AA era grau 2 e 38% grau 3, no grupo da variante GG 72% eram grau 2, 25% grau 3 e apenas 3% eram grau 1 (Tabela 4).

	<b>GA/AA (%)</b>	<b>GG (%)</b>
<b>Grau 1</b>	0	3
<b>Grau 2</b>	62	72
<b>Grau 3</b>	38	25

Tabela 4: Distribuição em porcentagem do grau histológico nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG.

Além do tipo de tumor, se ductal, lobular ou algum tipo específico (tubular, medular, adeno-cístico, mucinoso ou metaplásico), a análise histopatológica descreve ainda características, que se presentes, conferem maior agressividade ao tumor, como a presença de carcinoma ductal insitu associado, se há multifocalidade, a presença de invasão vasolinfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório ou necrose tumoral. Nessa análise os grupos foram semelhantes entre si conforme mostra a tabela 5.

	GA/AA (%)	GG (%)
<b>CDIS</b>	33	23
<b>Multifocalidade</b>	0	7
<b>IVL</b>	25	26
<b>IPN</b>	17	21
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	8	9
<b>Necrose</b>	17	14

Tabela 5: Distribuição em porcentagem de características histológicas nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG. Descrito Carcinoma ductal insitu (CDIS), multifocalidade, invasão vasolinfática (IVL), invasão perineural (IPN), infiltrado inflamatório e necrose tumoral.

Sobre a expressão de receptores hormonais vimos que tanto receptor de estrogênio (RE) – Figura 7, quanto receptor de progesterona (RP) – figura 8, foram mais expressos em pacientes do grupo de variante gênica GG, sendo 60% RE positivo no grupo GA/AA e 80% positivo no grupo GG e RP positivo 60% no grupo GA/AA e 75% no grupo GG, também conferindo uma tendência a menor agressividade no grupo da variante gênica GG.

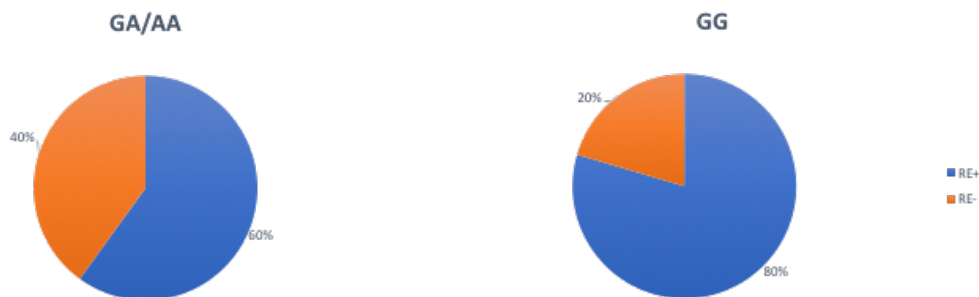


Figura 7: Distribuição em porcentagem da expressão de positividade de receptor de estrogênio (RE) nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG.

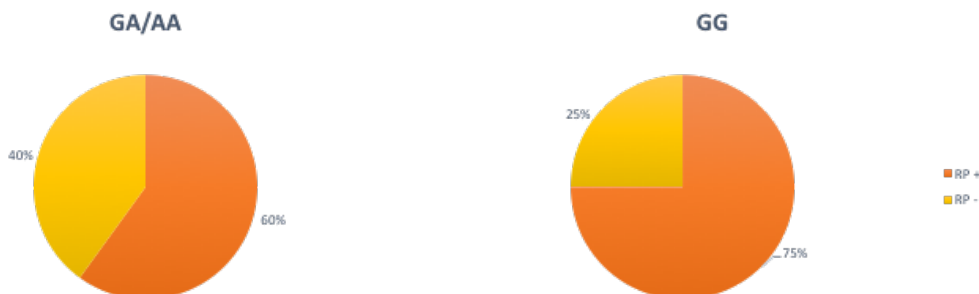


Figura 8: Distribuição em porcentagem da expressão de positividade de receptor de progesterona (RP) nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG

A análise da superexpressão de HER 2 também segue a mesma tendência, demonstrando tumores de pior prognóstico nas variantes GA/AA sendo representada por 20% das pacientes nesse grupo e 9 % no grupo GG (Figura 9).

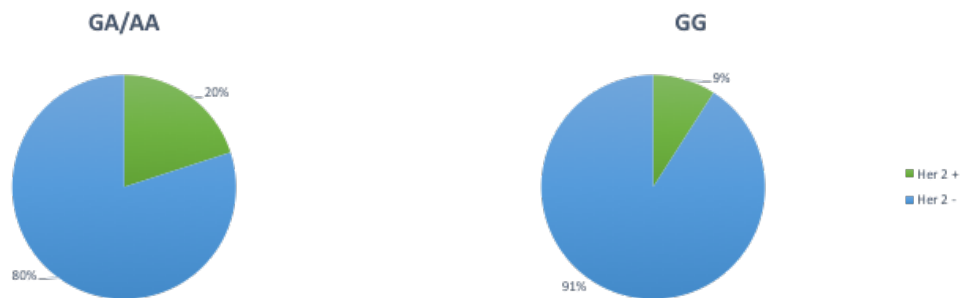


Figura 9: Distribuição em porcentagem da superexpressão da proteína HER 2 nas pacientes com as variantes gênicas GA/AA e GG

Para analisar o índice de proliferação celular no tumor dessas pacientes foi visto que ambos os grupos expressão em média 20% de Ki67 (Figura 10).

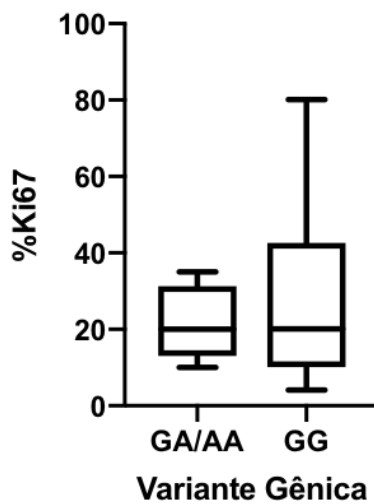


Figura 10: Porcentagem de expressão de Ki67. Do total de paciente, 45 tinham a expressão descrita em %, sendo 7 no grupo GA/AA e 38 no grupo GG.

## 5. Discussão

O polimorfismo rs2242652 foi descrito em algumas publicações relacionado ao aumento da chance de algumas neoplasias malignas, como câncer colorretal, próstata, pulmão e mama, porém como fator de diminuição do risco de mieloma múltiplo (74). Nesse trabalho foi feita a relação desse polimorfismo com o câncer de mama.

Existe uma complexa regulação genética da biologia dos telômeros, tendo a telomerase um papel crucial na carcinogênese. Isso se confirma com a relação do polimorfismo rs2242652 com o aumento no risco de câncer de esôfago com OR de 1,51 (79). Há descrição de uma relação de aumento do tamanho do telômero em pacientes usuárias de aspirina ou antiinflamatórios não-esteroidais que tiveram câncer de cólon e apresentavam polimorfismo do gene da telomerase no alelo rs2242652, principalmente com a variante gênica GG (80). O melanoma, por sua vez, é o cancer de pele mais estudado por ter um prognóstico pior que os outros, e quando as pacientes com esse tipo de câncer foram testadas para polimorfismos da telomerase identificou-se uma relação significativa do polimorfismo rs2242652 com essa neoplasia (81).

Encontramos no nosso estudo encontramos 33% das pacientes com variante gênica GA/AA com tumores triplo negativos e 19% na variante gênica GG, o que confere um pior prognóstico ao grupo da variante gênica com alelo A.

Os tumores Luminal A, que provavelmente constituem cerca de 40% de todos os cânceres de mama, geralmente apresentam alta expressão de genes relacionados a RE, baixa expressão de genes HER2 e baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular (82). São o subtipo mais comum e, em geral, têm o melhor prognóstico de todos os subtipos de câncer de mama.

Os tumores luminal B são menos comuns (cerca de 20%) têm expressão relativamente menor (embora ainda presente) de genes relacionados à RE, expressão variável HER2 e expressão mais alta índice de proliferação. Possuem um prognóstico pior do que os tumores luminais A (83).

O subtipo enriquecido-HER2 representa cerca de 10 a 15 por cento dos cânceres da mama e é caracterizada por uma elevada expressão do HER2, baixa ou nula expressão de luminal e alto índice de proliferação celular (84).

Os subtipos que não expressam nenhum tipo de receptor em membrana são os chamados triplo negativos. Esses podem ser basal-like, com baixa expressão de claudina entre outros menos comuns (85).

A taxa de proliferação celular no câncer de mama parece ser um fator prognóstico. Na imunohistoquímica o antígeno mais usado é o Ki-67. Quanto mais alto a sua expressão, maior a chance de comprometimento linfonodal, sendo pior o prognóstico (86).

O tamanho do tumor é um fator determinante para o prognóstico do paciente. Para os pacientes com tumores menores que 2 cm há indicação de uma sobrevida em 20 anos de 88%.

Os tumores de menor tamanho estão relacionados a um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre da doença (87).

A fase clínica do tumor (T) é avaliada por exame clínico e / ou imagiológico. O estado dos gânglios linfáticos regionais é um dos fatores prognósticos mais importantes no câncer de mama. O exame físico tem valor preditivo positivo da palpação clínica varia de 61 a 84 por cento, enquanto o valor preditivo negativo é de apenas 50 a 60 por cento (88).

No nosso estudo encontramos 30% das pacientes com variante gênica GA/AA em estadiamento IIIB e 9% na variante GG com esse estadiamento. Isso também nos dá uma visão de pior prognóstico para o grupo com variante gênica com alelo A.

Os carcinomas mamários São divididos em três graus com base em uma combinação de características arquiteturais e citológicas, geralmente avaliadas utilizando um sistema de pontuação baseado em três parâmetros (89):

Bem diferenciado (grau 1) que têm células que se infiltram no estroma como ninhos sólidos de glândulas. Os núcleos são relativamente uniformes, com pouca ou nenhuma evidência de atividade mitótica.

Moderadamente diferenciado (grau 2) que possuem células que se infiltram como ninhos sólidos com alguma diferenciação glandular. Há algum pleomorfismo nuclear e uma taxa mitótica moderada.

Pouco diferenciado (grau 3) que são compostos de ninhos sólidos de células neoplásicas sem evidência de formação de glândulas. Há atipia nuclear acentuada e considerável atividade mitótica.

No presente estudo no grupo da variante gênica GA/AA 38% eram grau 3 e 25% tinham esse grau na variante gênica GG, o que aponta um pior prognóstico nas pacientes encontradas com variante gênica com alelo A.

A presença de invasão vasolinfática parece ser um indicador de mau prognóstico, particularmente em tumores de maior grau. Isso foi demonstrado em um estudo de coorte de 1704 pacientes que não receberam nenhuma terapia adjuvante sistêmica, na qual a invasão vasolinfática peritumoral foi um fator de risco independente para recidiva local e morte (90). No nosso trabalho essa característica foi detectada em ¼ das pacientes em ambos os grupos.

A expressão do receptor de estrogênio (ER) e do receptor de progesterona (PR) geralmente está associada a melhores resultados de câncer de mama. Os dados sugerem que a sobrevida global, a sobrevida livre de doença (DFS) e o tempo até a falha do tratamento estão todos relacionados positivamente aos níveis de ER e PR (91).

Em um estudo com mais de 4.000 pacientes com câncer de mama operável inscritos nos ensaios clínicos I a V do Grupo Internacional de Estudo do Câncer de Mama, os pacientes com doença ER-positiva tiveram um risco anual menor de recorrência durante os primeiros cinco anos após o tratamento inicial. com aqueles com doença ER-negativa (9,9 versus 11,5%) (92).

A superexpressão de HER2 tem um prognóstico desfavorável, particularmente se os pacientes não são tratados com terapia alvo direcionados a HER2. Em mulheres com câncer



de mama, o principal benefício do teste de HER2 é seu valor preditivo para candidatos apropriados que devem receber agentes direcionados a HER2 (93).

A relação entre o status Ki67 e o prognóstico no câncer de mama precoce tem sido extensivamente estudada (85). Apesar da heterogeneidade nos ensaios clínicos e dos métodos de avaliação do Ki67 utilizados, os resultados de grandes meta-análises são consistentes com o valor prognóstico do Ki67. Uma metanálise que incluiu 46 estudos (mais de 12.000 pacientes) relatou que níveis elevados de Ki-67 estavam associados a (94): Maior risco de recaída em linfonodos positivos (razão de risco (RR) 1,59, IC 95% 1,35-1,87) e doença com linfonodos negativos (HR 2,31, IC95% 1,83-2,92). E pior sobrevida do câncer de mama em linfonodos positivos (FC para óbito 2,33; IC95% 1,83-2,95) e doença por linfonodos negativos (HR 2,54; IC95% 1,65-3,91).

Quando descrito em pacientes com câncer de mama, a relação do polimorfismo rs2242652 com o mesmo se faz em tumores de pior prognóstico, como nas pacientes mutadas para BRCA1, que geralmente apresentam tumores triplo negativos (73).

De maneira muito interessante, a variante gênica AA do rs2242652 ainda foi associada ao aumento no risco de câncer de mama de maneira isolada. Quando testada com outras variantes polimórficas de outros alelos não houve uma relação importante, indicando que os polimorfismo não se sobrepõe no risco dessa patologia, devendo ser estudados de maneira isolada (95).

Isso confirma as características demonstradas nas nossas análises e a grande tendência a ter tumor de pior prognóstico no grupo da variante que possui o alelo A, sendo um grande incentivo para que continuemos o estudo com maior número amostral afim de comprovar essa associação.

É importante ressaltar que todos os testes estatísticos foram realizados, mas não encontraram diferenças significantes devido ao baixo número amostral. Porém, é razoável propor que a associação com prognóstico ruim exista já que a diferença na frequência de muitas variáveis é notável entre os grupos, desfavorecendo sempre o grupo das variantes GA/AA, e que o aumento do número amostral poderá demonstrar se isso de fato ocorre. Esse estudo apresenta limitação e daremos continuidade ao trabalho afim de alcançar amostra suficiente para análises mais robustas dos dados.

## **6. Conclusão**

Este é o primeiro estudo que demonstra polimorfismo rs2242652 em população brasileira. Descrevemos a população de mulheres com esse polimorfismo quanto aos seus aspectos histopatológicos mais relevantes com relação ao câncer de mama. É bastante razoável propor que um pior prognóstico esteja associado ao alelo A, já que a diferença na frequência de muitas variáveis desfavorece sempre o grupo das variantes GA/AA. O aumento do número amostral poderá demonstrar se isso de fato ocorre.

## 7. Referências bibliográficas

1. Kesson EM, Allardice GM, George WD, et al. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ* 2012; 344: 2718.
2. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama> (acesso em 21/03/2019)
3. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107:djv048.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:7.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: racial disparities in breast cancer severity--United States, 2005-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012; 61:922.
6. Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:490.
7. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375:794.
8. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, et al. Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:48.
9. Van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2000; 152:514.
10. Farhat GN, Cummings SR, Chlebowski RT, et al. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:562.
11. Wong CS, Lim GH, Gao F, et al. Mammographic density and its interaction with other breast cancer risk factors in an Asian population. *Br J Cancer* 2011; 104:871.
12. Gierach GL, Ichikawa L, Kerlikowske K, et al. Relationship between mammographic density and breast cancer death in the Breast Cancer Surveillance Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1218.
13. Colditz GA. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:814.
14. Clarke C, Sutherland R. Progestin regulation of cellular proliferation: Update 1993. In: *Endocrine Reviews*, Horwitz K (Ed), Endocrine Society, Bethesda, MD 1993. p.132.
15. Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, et al. Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Ann Intern Med* 1999; 130:262.

16. Ritte R, Lukanova A, Tjønneland A, et al. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. *Int J Cancer* 2013; 132:2619.
17. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15:36.
18. Colditz GA, Frazier AL. Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:567.
19. Nichols HB, Berrington de González A, Lacey JV Jr, et al. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *J Clin Oncol* 2011; 29:1564.
20. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358:1389.
21. Gram IT, Park SY, Kolonel LN, et al. Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. *Am J Epidemiol* 2015; 182:917.
22. Cao Y, Willett WC, Rimm EB, et al. Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. *BMJ* 2015; 351:h4238.
23. Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med* 2010; 152:444.
24. Islami F, Liu Y, Jemal A, et al. Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status--a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2015; 26:2398.
25. Kobayashi LC, Janssen I, Richardson H, et al. Moderate-to-vigorous intensity physical activity across the life course and risk of pre- and post-menopausal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139:851.
26. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer Screening and Diagnosis. Fort Washington, PA 2014.
27. ACR BI-RADS Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System, 5th ed, D'Orsi C J, Sickles EA, Mendelson EB, et al (Eds), American College of Radiology, Reston, VA 2013.
28. Flobbe K, Bosch AM, Kessels AG, et al. The additional diagnostic value of ultrasonography in the diagnosis of breast cancer. *Arch Intern Med* 2003; 163:1194.
29. Bluemke DA, Gatsonis CA, Chen MH, et al. Magnetic resonance imaging of the breast prior to biopsy. *JAMA* 2004; 292:2735.
30. Barlow WE, Lehman CD, Zheng Y, et al. Performance of diagnostic mammography for women with signs or symptoms of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1151.

31. Pisano ED, Fajardo LL, Caudry DJ, et al. Fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable breast lesions in a multicenter clinical trial: results from the radiologic diagnostic oncology group V. *Radiology* 2001; 219:785.
32. Scott S, Morrow M. Breast cancer. Making the diagnosis. *Surg Clin North Am* 1999; 79:991.
33. Levin DC, Parker L, Schwartz GF, Rao VM. Percutaneous needle vs surgical breast biopsy: previous allegations of overuse of surgery are in error. *J Am Coll Radiol* 2012; 9:137.
34. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995; 75:257.
35. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046.
36. Dillon DA, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: *Diseases of the Breast*, 4th, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2009. p.386.
37. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747.
38. Russo J, Balogh GA, Fernández SV et al. The concept of stem cell in mammary gland and its implication morphogenesis, cancer and prevention. *Front Biosci* 2006; 11: 151-172.
39. Birbaum D, Bertucci F, Ginestier C et al. Basal and luminal cancers: basic or luminous, *Int J Oncol* 2004; 25: 249-258.
40. Ferber E, Cameron R. The sequential analysis of cancer development. *Adv Cancer Rev* 1980; 31: 125-226.
41. Barros ACS, Muranaka E, Mori LJ et al. Induction of experimental mammary carcinogenesis in the rats with 7,12-dimethylbenz (1) anthracene. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2004; 59 (5): 257-261.
42. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 70-76.
43. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1616-1622.
44. Dawood S, Broglio K, Valero V et al. Circulation tumor cells in metastatic breast cancer. From prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008; 113: 2422-2430.
45. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, et al. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med* 2015; 17:70.
46. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Genetic/Familial High-risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 2.2018.
47. Syngal S, Furniss CS. Germline Genetic Testing for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma at Time of Diagnosis. *JAMA* 2018; 319:2383.

48. Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2011; 2:475.
49. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 2010; 59:975.
50. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, et al. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res* 2012; 18:400.
51. Guilford P, Humar B, Blair V. Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. *Gastric Cancer* 2010; 13:1.
52. Shulman LP. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2010; 37:109.
53. Barbaro PM, Ziegler DS, Reddel RR. The wide-ranging clinical implications of the short telomere syndromes. *Intern Med J* 2016; 46:393.
54. Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood* 2007; 110:1439.
55. Mathieu N., Pirzio L., Freulet-Marrière M.A., Desmaze C., Sabatier L. Telomeres and chromosomal instability. *CMLS, Cell. Mol.* 2004; 61: 641–656.
56. Bernal A, Tussel L, Telomeres: implication for cancer development. *Int Journal of molecular science* 2018; 19: 294.
57. Smogorzewska A., van Steensel B., Bianchi A., Oelmann S., Schaefer M. R., Schnapp G. et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20: 1659–1668.
58. Kim S. H., Kaminker P. and Campisi J. TIN2, a new re- gulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 1999, 23: 405–412.
59. Van Steensel B., Smogorzewska A. and de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998, 92: 401–413.
60. Cleal K, Norris K, Baird D. Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. 2018, 19: 482.
61. Zou, P. et al. The TERT rs2736100 Polymorphism and Cancer risk- a meta- analysis based on 25 case-control studies. *BMC cancer* 2012; 12 (7).
62. Guerra, M. R. et al. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública - Rio de Janeiro* 2009; 25 (11): 2455-2466.
63. SBMSP. Assinaturas genéticas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastologia Regional de São Paulo* 2012; 15 (97).
64. Zhou, P. et al. Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. *Journal of Surgical Research* 2014; 191 (1): 156–160.
65. Shay J. W. and Wright W. E. Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1996, 8: 66–7.

66. Borah, S.; Xi, L.; Zaug, A.J.; et al. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*. 2015, 347, 1006–1010.
67. Saha, D.; Singh, A.; Hussain, T.; Srivastava, V. et al. Chowdhury, S. Epigenetic suppression of human telomerase (hTERT) is mediated by the metastasis suppressor NME2 in a G-quadruplex-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 15205–15215.
68. Genesca, A.; Pampalona, J.; Frias, C.; Dominguez, D.; Tusell, L. Role of Telomere Dysfunction in Genetic Intratumor Diversity. *Adv. Cancer Res.* 2011, 112, 11–41.
69. Svenson, U. Long leukocyte telomere length in prostate cancer patient at diagnosis associated with poor metastasis-free and cancer-specific survival. *Tumour Biol.* 2017, 39.
70. Svenson, U.; Nordfjall, K.; Stegmayr, B.; et al. Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells. *Cancer Res.* 2008, 68, 3618–3623.
71. Mocellin S, et al. Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-Analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2012.
72. Andrew JP, Roger KW, et al. Telomere Length, Telomere-Related Genes, and Breast Cancer Risk: The Breast Cancer Health Disparities Study. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52 (7).
73. Bojesen ES.; Polley KA.; Johnatty SE. et al. Multiple independent variants at the *TERT* locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 2013, 45(4): 371–382.
74. Campa D, Martino A, Varkonyi J, et al. Risk of multiple myeloma is associated with polymorphisms within telomerase genes and telomere length. *Int. J. Cancer* 2014; 00.
75. Ren G, Liu X, Yu Z, et al. Association of *TERT* polymorphisms with chronic hepatitis B in a Chinese Han population. *Oncotarget* 2018; 9: 9199-9205.
76. Zhang S, Ji G, Liang Y, et al. Polymorphisms in Telomere Length Associated *TERC* and *TERT* predispose for Ischemic Stroke in a Chinese Han population. *Nature Scientific Reports* 2017; 7: 40151.
77. Myller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16 (3): 1215.
78. NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
79. Wu Y, Yan M, Li J, et al. Genetic polymorphism in TERT are associated with increased risk of esophageal cancer. *Oncotarget*, 2017; 8 (6): 1023-1030.
80. Pellatt AJ, Wolff RK, Lundgreen A, et al. Genetic and lifestyle influence on telomere length and subsequent risk of colon cancer in a case control study. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012; 3(3); 184-194.
81. Nan H, Qureshi AA, Prescott J. Genetic variants in telomere-maintaining genes and skin cancer risk. *Hum Genet* 2011; 129(3): 247–253.
82. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:560.

83. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010; 28:1684.
84. Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol* 2008; 26:5697.
85. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R68.
86. Luporsi E, André F, Spyrtos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132:895.
87. Abreu, E, Koifman, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002; 48 (1): 113–131.
88. Lanng C, Hoffmann J, Galatius H, Engel U. Assessment of clinical palpation of the axilla as a criterion for performing the sentinel node procedure in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33:281.
89. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002; 41:154.
90. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994; 24:41.
91. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:1531.
92. Colleoni M, Sun Z, Price KN, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol* 2016; 34:927.
93. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
94. Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96:1504.
95. Kote-Jari Z, Saunders EJ, Leongamornlert DA. Fine-mapping identifies multiple prostate cancer risk loci at 5p15, one of which associates with TERT expression. *Human Molecular Genetics* 2013; 22 (12) 2520–2528.

## 8. Apêndices

### Apêndice A: Termo de Consentimento HUB



#### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE*

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto "Estudo de marcadores moleculares associados a resposta de pacientes oncológicos a quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública". O presente documento contém informações importantes sobre o estudo, caso não se sinta esclarecido(a), ou tenha qualquer dúvida durante a leitura, poderá solicitar explicações adicionais.

Resumidamente, trata-se de um estudo científico que visa desenvolver novos testes de laboratório para ajudar na escolha do melhor medicamento a ser usado em pacientes com câncer. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado dos voluntários, assim como os dados de evolução clínica registrados em prontuário médico referentes a resposta aos tratamentos aplicados.

Ao aceitar participar do estudo, o único desconforto ao qual será submetido é a coleta de sangue por punção de veia periférica, procedimento que envolve baixo risco, mas moderado grau de desconforto físico. Assim, ao assinar este termo, o(a) Senhor(a) autorizará a coleta de 4 mL de sangue, que será feita por profissional qualificado, em ambiente adequado e com material estéril e descartável, a fim de minimizar qualquer risco de dano físico, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no seu prontuário médico. O acesso aos resultados obtidos com o estudo, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta terapêutica, aconselhamento genético ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

O(A) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, poderá fazer contato com a equipe caso precise de assistência em relação aos procedimentos utilizados no estudo, ou sempre que julgar necessário, e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a participar do estudo, ou desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração, assim como não haverá também despesa de qualquer natureza.

É garantido o seu direito de reivindicar indenização diante de eventuais danos decorrentes da participação no estudo.

O sangue coletado, após processado, irá compor biorepositório (será armazenado para fins de pesquisa), e poderá ser usado futuramente para estudos de polimerfismo (a exemplo do descrito neste documento), em conjunto com as informações clínicas obtidas por meio de análise de prontuário médico. Não faz parte da metodologia do estudo o rastreamento do indivíduo doador do material e das informações.

Para solicitar qualquer informação a respeito da pesquisa, deve-se fazer contato com o responsável pelo estudo, professor Diêgo Madureira de Oliveira, através do e-mail [dmadureira@unb.br](mailto:dmadureira@unb.br), pelo telefone institucional (61) 3107-1998, ou no endereço "FCE – Faculdade de Ceilândia - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Universidade de Brasília, CEP: 71220-900". O projeto foi aprovado pelo CEP/FS-UnB (Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF, telefone (061) 3107-1947 e-mail: [cepfs@unb.br](mailto:cepfs@unb.br)). Esse TCLE está em duas vias (uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a), o sujeito da pesquisa) e foi elaborado segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) N° 466, de 12 de dezembro de 2012, especialmente em seu item IV.3, cujas exigências o responsável pelo projeto compromete-se a seguir; e a luz da Resolução CNS N° 441 de 12 de maio de 2011 para composição de biorepositório.

\_\_\_\_\_  
Nome / assinatura

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável  
Nome e assinatura

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_



## Apêndice B: Termo de Consentimento IHBDF



### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE**

A Senhora está sendo convidada a participar do projeto **"Análise de polimorfismos do gene da telomerase como potenciais marcadores prognósticos no câncer de mama"**. O presente documento contém informações importantes sobre o estudo, caso não se sinta esclarecida, ou tenha qualquer dúvida durante a leitura, poderá solicitar explicações adicionais.

Resumidamente, trata-se de um estudo científico que visa identificar novos marcadores prognósticos para o câncer de mama. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado de voluntários, assim como os dados de evolução clínica registrados em prontuário médico.

Ao aceitar participar do estudo, o único desconforto ao qual será submetido é a coleta de sangue por punção de veia periférica, procedimento que envolve baixo risco, mas moderado grau de desconforto físico. Assim, ao assinar este termo, a Senhora autorizará a coleta de 5 mL de sangue, que será feita por profissional qualificado, em ambiente adequado e com material estéril e descartável, a fim de minimizar qualquer risco de dano físico, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no seu prontuário médico. O acesso aos resultados obtidos com o estudo, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta terapêutica, aconselhamento genético ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, poderá fazer contato com a equipe caso precise de assistência em relação aos procedimentos utilizados no estudo, ou sempre que julgar necessário, e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la.

Não faz parte da metodologia do estudo o rastreamento do indivíduo doador do material e das informações. Para solicitar qualquer informação a respeito da pesquisa, deve-se fazer contato com o responsável pelo estudo, Miriam Monteiro Alvares, através do e-mail [miriam\\_alvares@yahoo.com.br](mailto:miriam_alvares@yahoo.com.br), ou no endereço St. Médico Hospitalar Sul – 301, Asa Sul – Brasília - DF. Este projeto foi aprovado pelo CEP/FEPECS (Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde do Distrito Federal (St. Médico Hospitalar Norte, conjunto A, Bloco 1). Este documento está em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com a Senhora, o sujeito da pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Nome / assinatura

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável  
Nome e assinatura

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Apêndice C: Voucher para coleta de sangue no Sabin



### VAUCHER PARA AUTORIZAÇÃO DE EXAMES – NAP

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOME DO PACIENTE:

DATA DE NASCIMENTO:

PESQUISA: "Análise do polimorfismo da telomerase e expressão da enzima no tecido tumoral como fatores prognósticos para o câncer de mama".

PESQUISADOR: Dr. Diego Madureira de Oliveira (CRM1059793)

Solicitação:

**Nome do Exame**

Coleta de tubo de sangue EDTA

**Código**

EDTANAP

Convênio: 3491 – BSB-IS NAP KATHERINE RODRIGUES

O tubo com o sangue poderá ser colhido em qualquer unidade do laboratório Sabin.

**Recepção: Por favor desconsidere a data de entrega do resultado, para essa pesquisa não há resultado. É coletado somente um tubo de sangue que será entregue ao pesquisador, para que os exames possam ser realizados na UnB. Nós do Sabin não iremos realizar exames, somente a coleta do tubo.**

**Mandar esse tubo separado aos cuidados de Evanuzia – Triagem escrito "Material pesquisa NAP – tubo EDTA)"**

**Guia deve ser mandada no envelope para Simone Lima - NAP**

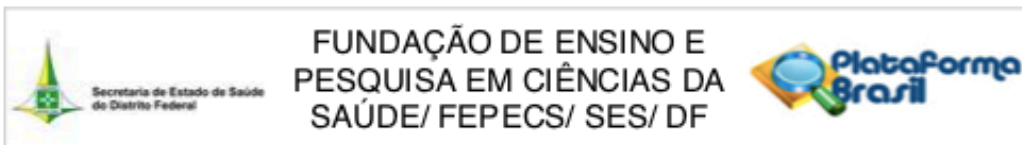
Dúvidas: Simone Lima  
NAP  
(61) 3329-8000 (ramal 3217)  
e-mail: [simonefma@sabin.com.br](mailto:simonefma@sabin.com.br)

## Apêndice D: Tabela com dados das 54 amostras que apresentaram polimorfismo rs2242652

Amostra	Pos	Altera	DMC	Índice de divergência	BE	BP	IG 67	Corb-62	Classificação final	T	N	M	Agrupamento	Tamanho	Grav	CDIS associado	Modificadores de data	Invasão populacional	Invasão pontual	Idiomas predominante	Nome animal	Lafandas isoladas	Lafandas associadas	Lafandas rs2242652 (GA)	
153	50,95	1,71	26,902035	35	-	-	-	-	triplo negativo Laminid B	1	0	0	1	0,2	1	N		N			S		2	2	AA
60	66,7	1,59	26,38343	56	90	-	20	-	triplo negativo Laminid B	2	1	0	IBB	1,5	2			N							GA
123	82	1,57	33,26707	29	-	-	-	-	triplo negativo Laminid B	3	2	0	IA	3	3			N							GA
129	69,3	1,44	33,420139	53	-	20	14	3+	He-2	2	0	0	IA	4,5	3	S	N	N	N			2	0	GA	
214	54	1,53	23,660651	51	-	-	80	-	triplo negativo Laminid B	1	0	0	I	2			N	N	N				6	0	GA
221	54	1,55	22,476387	53	+	+	-	-	triplo negativo Laminid B	3	2	0	IBB												GA
228	72	1,56	29,585799	67	100	20	35	-	Laminid B	2	0	0	IA	5	2	S	N	S	S			8	1	GA	
230	57	1,55	23,722806	41	80	50	30	-	Laminid B	4B	0	0	IBB	2,3	2							5	1	GA	
232	48	1,5	21,33333	56	95	80	20	3+	He-2	2	1	0	IBB	3,1	2	S	N	N	N			11	1	GA	
245	53	1,6	26,702125	45	80	40	10	-	Laminid A	4B	1	0	IBB	4	2	S	N	S	S			10	3	GA	
3	59,85	1,6	23,379086	48	70	90	10	-	Laminid A	1	1	0	IBB	2	2							3	0	GG	
4	105,6	1,7	36,539792	34	100	60	20	-	Laminid B	1	0	0	I	1,4											GG
6	61	1,55	25,390219	55	+	+	-	-	Laminid B	2	0	0	IA	2	2										GG
36	90,2	1,57	36,593777	78	-	-	60	3+	He-2	2	1	0	IBB	2	3	S	N	S	N			2	2	GG	
40	60,4	1,57	24,504037	45	-	-	30	-	triplo negativo Laminid B	3	0	0	IA	1,2	3		N	N	N						GG
53	118	1,81	36,018437	35	-	-	80	-	triplo negativo Laminid B	4B	2	0	IBB	5,2	3							11	0	GG	
54	46,9	1,51	20,669273	38	20	15	40	3+	He-2																GG
56	63,75	1,56	26,195759	51	90	80	5	-	Laminid A	1	0	0	I	3	2	S		N	N			3	0	GG	
58	82,45	1,6	32,207031	51	+	+	5	-	Laminid A	3	1	0	IBB	1,4	2	S	S	N	S			N	2	0	GG
59	74,3	1,55	30,924119	46	90	90	30	-	Laminid B					2,7	3		N	N	N			4	1	GG	
71	66	1,55	27,471384	58	10	20	20	-	Laminid B					2,1	3	N		N	N						GG
95	66,9	1,61	25,809189	34	-	-	70	3+	He-2	3	1	0	IBB	2,5	2										GG
104	83	1,56	34,105851	54	40	-	40	-	Laminid B	2	1	0	IBB		2										GG
105	68	1,55	28,30385	41	90	5	5	-	Laminid A	3	0	0	IA												GG
114	53,2	1,53	22,726302	49	90	90	5	-	Laminid A	2	0	0	IA				S	S	N			N	7	5	GG
116	101			51	90	90	14	-	Laminid A	2	0	0	IA	3,5	2										GG
119				47	80	80	15	-	Laminid B	2	0	0	IA	4		S						2	0	GG	
120	60	1,66	21,773842	30	70	90	25	-	Laminid B	1	0	0	I	1,5	2										GG
122	78			28	67	10	20	2+	Laminid B	1	1	0	IA												GG
126	80,3	1,68	28,450664	66	+	-	-	-	Laminid B	2	0	0	IA	3	2	S	N	S	S			11	2	GG	
128	66,2	1,6	25,859375	64	-	-	20	-	triplo negativo Laminid B	2	0	0	IA	1,5	2							5	1	GG	
130	71,6	1,52	30,990305	56	1	1	10	-	triplo negativo Laminid B	2	1	0	IBB	1,8	2										GG
136	65	1,65	23,875115	40	+	+	20	-	Laminid B	1	1	0	IA												GG
206	74	1,68	26,218821	60	90	90	70	-	Laminid B	2	1	0	IBB	4,5	2	S	S	N	N			14	0	GG	
207	70	1,54	33,310845	52	60	40	4	-	Laminid A	2	0	0	IA	2,1	2	N	N	N	N			8	0	GG	
210	58	1,56	23,833065	70	-	-	-	-	triplo negativo Laminid B																GG
212	87	1,59	34,413196	42	90	30	70	-	Laminid B	4B	1	0	IBB	0,4		N	N	N	N			14	0	GG	
215	87	1,53	37,165193	40	80	80	20	-	Laminid B	2	1	0	IBB	5	2	S	N	S	S			10	1	GG	
220	63	1,63	23,711845	50	+	+	10	-	Laminid A	1	0	0	IA												GG
223	70	1,6	27,34375	50	+	+	10	-	Laminid A																GG
225	62	1,56	25,47666	55	-	-	-	-	triplo negativo Laminid B	3	2	0	IBB	0,4	2	S	N	N	N			2	0	GG	
226	70	1,58	28,040378	51	50	50	10	-	Laminid A	1	0	0	IA	1,7	2	S	N	S	N			12	0	GG	
227	78	1,75	25,469388	47	60	70	14	-	Laminid B	4B	1	0	IBB	2,5	2	N	N	N	N			13	3	GG	
231	55	1,6	21,484375	65	+	+	-	-	Laminid B	2	0	0	IA												GG
234	60	1,66	21,773842	56	90	50	10	-	Laminid A	2	0	0	IA	3,3	2	N	N	S	S			13	8	GG	
235	65	1,67	23,30668	52	60	5	40	3+	He-2	2	0	0	IA									1	0	GG	
236	84	1,58	33,648454	47	+	+	-	-	triplo negativo Laminid B	2	1	0	IBB									3	0	GG	
238	106	1,66	38,467121	40	-	-	50	-	triplo negativo Laminid B	2	1	0	IBB									19	0	GG	
239	72	1,59	28,479886	32	-	-	60	-	triplo negativo Laminid B	2	1	0	IBB	2,2	2	N	N	S	N			18	1	GG	
240	58	1,56	23,833065	51	+	+	45	-	Laminid B																GG
241	55	1,5	24,444444	73	100	30	20	-	Laminid B	2	0	0	IA	3,5	3	N	N	N	S			16	0	GG	
242	70	1,6	27,34375	49	+	+	80	-	Laminid B	2	0	0	IA	0,9	2	N	N	S	S			8	3	GG	
246	64	1,58	25,636917	55	90	80	20	-	Laminid B	1	0	0	I	0,9	2	N	N	S	N			3	1	GG	
247	70	1,61	27,065131	33	+	+	15	-	Laminid B	2	2	0	IBB	3,1	2	S	N	S	N			19	16	GG	

## 9. Anexos

### Anexo A: Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise de polimorfismos do gene da telomerase como potenciais marcadores prognósticos no câncer de mama

**Pesquisador:** MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 81655317.0.0000.5553

**Instituição Proponente:** DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.836.017

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de monografia para a obtenção do título de Mestre no PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS - UnB.

O projeto foi analisado, inicialmente, pela CONEP (Parecer Consubstanciado: 2.548.411) por ter sido "enquadrado como pertencente à área temática "Genética Humana: Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais". Entretanto, "a CONEP entende que o protocolo de pesquisa não se enquadra na Área Temática 'Genética Humana: Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais' (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Carta Circular nº 172/2017/CONEP/CNS/MS)".

##### Objetivo da Pesquisa:

###### OBJETIVO PRIMARIO

Descrever novos potenciais marcadores prognósticos para o câncer de mama.

###### OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS  
**Bairro:** ASA NORTE **CEP:** 70.710-904  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61) 3325-4940 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 2.836.017

- a) identificar o perfil genético da população local em relação à região do gene estudado;
- b) estudar possíveis associações entre os polimorfismos descritos e variáveis clínicas de interesse;
- c) identificar polimorfismos presentes na região promotora do gene da telomerase com potencial para marcador prognóstico.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

"Riscos:

Mínimo, apenas o inerente ao procedimento coleta de sangue

Benefícios:

Os benefícios para os participantes serão indiretos, na forma de possível identificação de novo indicador prognóstico e de resposta terapêutica, ou eventualmente diretos, uma vez que achados que possam implicar em alteração da conduta médica em curso em favor do paciente poderão ser reportados aos mesmos ou aos responsáveis pelo acompanhamento clínico destes, com a devida autorização."

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo de coorte transversal, que tem como objetivo descrever novos potenciais marcadores prognósticos para o câncer de mama. A população será constituída por 112 pacientes com câncer de mama, atendidas no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) no período de outubro de 2017 a janeiro de 2019. Serão coletados dados de caracterização da doença e evolução clínica bem como material biológico para as análises moleculares. A coleta de dados seguirá as seguintes etapas:

- Coleta de dados: dados clínicos obtidos através dos prontuários médicos, para a construção de um banco de dados. Todas as informações coletadas serão armazenadas em um banco de dados através do programa Epi Info (versão 7).

- Análise molecular: O estudo do gene citado se fará por meio de sequenciamento da região promotora do gene TERT após amplificação por PCR convencional. As reações de amplificação serão realizadas no Laboratório Multidisciplinar de Saúde da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, e os sequenciamentos serão feitos por empresa especializada em sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências e eletroferogramas obtidos serão analisados utilizando o software Chromas Lite (versão 2.01, Technelysium Pty Ltd.) e os alinhamentos, utilizando o BLAST (NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), revelarão as regiões polimórficas.

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3325-4940

**E-mail:** [comitedeetica.secretaria@gmail.com](mailto:comitedeetica.secretaria@gmail.com)



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 2.836.017

- Coleta de sangue: Serão coletados 5 mL do sangue das pacientes, com tubo de tampa roxa com EDTA específico para biologia molecular. A coleta será realizada no momento de procedimento de coleta de rotina, para evitar que o procedimento invasivo seja efetuado duas vezes.
- Extração de DNA: Será feito, segundo metodologia de SHEN e colaboradores, por extração padrão com fenol e clorofórmio/álcool isoamílico e tratado com RNase, conforme recomendações do fabricante do kit específico a ser empregado. As amostras de DNA serão etiquetadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Análises Estatísticas: Todos os dados constituirão um banco de dados e terão a distribuição avaliada quanto a normalidade. O estudo não prevê envio para o exterior de algum material genético humano (DNA/RNA etc.) ou amostra biológica humana. Quando estiver previsto no estudo que tais etapas serão realizadas apenas no Brasil, o estudo não deverá ser enquadrado nesta área temática.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A resposta às pendências é satisfatória. Projeto aprovado.

O pesquisador assume o compromisso de garantir o sigilo que assegure o anonimato e a privacidade dos participantes da pesquisa e a confidencialidade dos dados coletados. Os dados obtidos na pesquisa deverão ser utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatório parcial e final de acordo com o desenvolvimento do projeto da pesquisa, conforme Resolução CNS/MS nº 466 de 2012.

O presente Parecer de aprovação tem validade de até dois anos, mediante apresentação de relatórios parciais, e após decorrido esse prazo, caso necessário, deverá ser apresentada emenda para prorrogação do cronograma.

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4940

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com





Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

FUNDAÇÃO DE ENSINO E  
PESQUISA EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF



Continuação do Parecer: 2.836.017

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_957002.pdf	30/07/2018 12:49:15		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	30/07/2018 12:48:24	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	Carta.doc	30/07/2018 12:47:15	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	30/07/2018 12:44:39	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	fapdf.docx	05/06/2018 22:21:59	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoTelomerase.pdf	28/11/2017 16:57:57	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	Diego.pdf	23/10/2017 17:06:06	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	JoaoNunes.pdf	23/10/2017 17:05:30	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	JoaoBatista.pdf	23/10/2017 17:04:46	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Outros	Miriam.pdf	23/10/2017 17:03:30	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia.pdf	11/08/2017 15:55:14	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito
Orçamento	Orcamento.doc	12/07/2017 17:13:34	MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 22 de Agosto de 2018

Assinado por:  
DILLIAN ADELAINÉ CESAR DA SILVA  
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

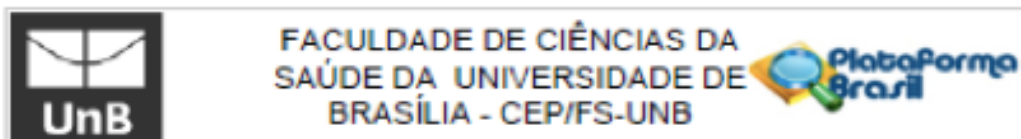
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4940

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com

## Anexo B:



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública

**Pesquisador:** Diégo Madureira de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 30711114.3.0000.0030

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ceilândia - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Patrocinador Principal:** Departamento de Ciência e Tecnologia

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 975.592

**Data da Relatoria:** 03/02/2015

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Res. CNS 466/2012 e complementares.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa inicial.

BRASÍLIA, 06 de Março de 2015

---

Assinado por:  
Marie Togashi  
(Coordenador)