

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA



**Relação dos polimorfismos dos genes TP53 e ATM em pacientes
com câncer de mama e efeitos colaterais à radioterapia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE
MESTRADO EM GENÉTICA, DA PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA E
EXTENSÃO, DA PONTIFÍCIA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM GENÉTICA.

João Lino Franco Borges

Orientador: Profa Dra *Renata de Bastos Ascenço Soares*

Instituição: PUC-Goiás

Goiânia - GO

- Março 2014 -

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA



**Relação dos polimorfismos dos genes TP53 e ATM em pacientes
com câncer de mama e efeitos colaterais à radioterapia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE
MESTRADO EM GENÉTICA, DA PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA E
EXTENSÃO, DA PONTIFÍCIA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM GENÉTICA.

João Lino Franco Borges

Orientador: Profa Dra *Renata de Bastos Ascenço Soares*

Instituição: PUC-Goiás

Goiânia - GO

- Março 2014 -

Borges, João Lino Franco.
B732r Relação dos polimorfismos dos genes TP53 e ATM em
pacientes com câncer de mama e efeitos colaterais à radioterapia
[manuscrito] / João Lino Franco Borges. – 2014.
76 f. : il. ; graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2014.

“Orientadora: Profa. Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares”.

Bibliografia.

Inclui lista de abreviaturas.

1. Mamas – Câncer. 2. Radioterapia. 3. Genes. I. Título.

CDU 618.19-006(043)

Fomento e Instituições

Fomento:

- Chamada Pública MCT/FINEP/AÇÃO TRANSVERSAL: REDE GENOPROT 08/2007, Convênio01.07.0536.00.

- Bolsa FAPEG CH001/2012.

Instituição participante:

Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Instituto de Ensino e Pesquisa, Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 83/2014

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: JOÃO LINO FRANCO BORGES
DEFENDIDA EM 28 DE MARÇO DE 2014 E aprovado COM CONCEITO A

BANCA EXAMINADORA

Renata BA Soares

Profª. Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares
(presidente-orientador)

Isabela Jubé Wastowski

Profª. Dra. Isabela Jubé Wastowski / PUC Goiás
(membro interno)

Larissa Cardoso Marinho

Profª. Dra. Larissa Cardoso Marinho / UnB
(membro externo)

Aos meus pais, Joarides e Adalzira, meus irmãos e à minha esposa Marcela pelo estímulo, incentivo e amor.

Agradecimentos

Agradeço aos colegas do curso de mestrado em genética da PUC e a todos os professores, que me fizeram enxergar com um novo olhar, uma prática médica diferente, baseada na individualidade genética de cada paciente que assisto e que vou assistir.

Aos meus amigos e familiares agradeço pelo apoio. Em especial aos meus pais e irmãos que sempre incentivaram minhas escolhas valorizando meus potenciais.

Agradeço a FAPEG, que permitiu com que eu concluísse o programa de mestrado em Genética, com a ajuda através da bolsa com a qual fui contemplado.

Obrigado à colega e mentora Dra Eliane da Silva Ribeiro, que sempre, desde a residência médica, me orientou no caminho que deveria seguir e que me apresentou a possibilidade de ser mestre em uma área que muitas vezes não chama a atenção dos médicos, pela sua complexidade, mas que é infinita em suas possibilidades.

Obrigado à minha orientadora que teve a paciência de estar comigo nestes dois anos. Que entendeu todos os momentos de dificuldade e minhas ausências presenciais, devido ao estilo de vida e a realização de duas especializações simultâneas. Obrigado Renata, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais que me passou neste período.

Agradeço também a Marcela, minha esposa e nova companheira de vida, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e dando suporte emocional às minhas escolhas e nas dificuldades que elas me trazem. Obrigado também a minha nova família, Neide e Marcel, que me tiveram como um verdadeiro filho neste período tumultuado que coincidiu com o mestrado, que foi a realização do nosso casamento. Obrigado!

Sumário

Sumário	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	x
Resumo	15
Abstract	16
I - INTRODUÇÃO	17
1.1 – Dados gerais - Câncer de mama	17
1.2 - Radioterapia para câncer de mama	20
I.3 - Dano ao DNA e Vias de Reparo	23
1.3.1- Mecanismo de reparo de DNA.....	25
1.3.2- Reversão da lesão.....	25
1.3.3-Reparo por excisão.....	26
1.3.3.1-Reparo por excisão de bases (BER).....	26
1.3.3.2-Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	26
1.3.4-Reparo de emparelhamento errôneo (MMR)	27
1.3.5- Reparo de quebras de dupla fita no DNA.....	28
1.3.6-Reparo por recombinação homóloga (HR).....	28
1.3.7-Reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)	29
I.4 - Gene TP53	30
I.4.1 Polimorfismos no gene TP53	34
I.5 – Gene ATM	35
I.5.1 - Polimorfismos no gene ATM.....	36
II - JUSTIFICATIVA	37
III - OBJETIVOS	38
IV - METODOLOGIA.....	39
4.1 - Seleção de pacientes	39
4.2 - Classificação da toxicidade.....	39
4.3 - Critérios de inclusão	40
4.4 - Critérios de exclusão	40
4.5 - Obtenção das amostras.....	40
4.6 - Extração de DNA.....	40

4.7 - Amplificação das regiões de TP53 e ATM	41
4.8 - Reação de Seqüenciamento.....	43
4.9 - Análise estatística.....	44
4.10 - Aspectos éticos.....	44
V - RESULTADOS.....	45
VI - Discussão.....	58
VII – Conclusão	64
Perspectivas	65
VIII – REFERÊNCIAS.....	67
IX – Anexos	72

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Estrutura da proteína p53, que consiste de 393 aminoácidos com 5 domínios bem definidos.....	30
Figura 2. Localização cromossômica do gene TP53.....	31
Figura 3. Representação esquemática das 12 isoformas de p53 humanas identificadas, com seus domínios e nomenclatura.....	32
Figura 4. Esquema mostrando as vias de sinalização de TP53 e suas consequências assim como os genes envolvidos.....	33
Figura 5. Localização cromossômica do gene ATM. Este gene localiza-se no braço longo do cromossoma 11 (11q22.3).....	35
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a integridade do DNA genômico total extraído das amostras de 60 das 78 pacientes incluídos no estudo.....	47
Figura 7. Análise eletroforética do fragmento amplificado do gene TP53 de 527 pares de bases.....	48
Figura 8. Análise eletroforética do fragmento amplificado do gene ATM de 317 pares de bases.....	48
Gráfico 1 – Frequência das pacientes em relação ao estadiamento clínico no momento do diagnóstico.....	47
Gráfico 2- Risco de ocorrência de efeito tardio na pele (RTOG) alto grau e baixo grau.....	54
Gráfico 3- Risco acumulado de ocorrência do efeito tardio do subcutâneo...	57

Lista de Tabelas

	Pag
Tabela 1 - Polimorfismos dos gene TP53 e ATM.....	43
Tabela 2 - Frequência das características clínicas das pacientes e do tratamento.....	45
Tabela 3 -Morbidade segundo RTOG (grau de toxicidade)	49
Tabela 4 Associação dos efeitos agudos da RT na pele, com as variáveis clínicas e com a presença dos polimorfismos estudados.....	50
Tabela 5 - Associação da idade e características do tratamento com a toxicidade aguda de pele.....	51
Tabela 6 - Associação das variáveis qualitativas com os efeitos tardios da radiação na pele.....	52
Tabela 7 - Associação das variáveis quantitativas com os efeitos tardios da radiação na pele.....	53
Tabela 08 - Associação das variáveis qualitativas com os efeitos tardios no subcutâneo da radiação.....	55
Tabela 9 - Associação entre as variáveis quantitativas e os efeitos tardios da radiação no subcutâneo.....	56

Lista de Abreviaturas e Siglas

A: Adenina

AG: Alto grau

ACCG: Associação de Combate ao Câncer em Goiás

AFIP: Armed Forces Institute of Pathology

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related

BER: Base Excision Repair

BG: Baixo grau

BRCA1: Breast cancer 1 gene

BRCA2: Breast cancer 2 gene

Ca: câncer

CAMP: Complexo aréolo-papilar

CEP-ACCG: Comitê de ética em pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

cGy: centi Grays

Chk2: Checkpoint Kinase 2

CNS: Conselho Nacional de Saúde

DBD: DNA binding domain

DNA: Desoxiribonucleic acid

DNA-PKcs: Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide

dNTP: Desoxiribonucleotide triphosphate (desoxiribonucleotídeo trifosfato)

DM: Diabetes mellitus

DSBR: Double Strand Break Repair

ECM: Exame clinic das mamas

ERCC1-XPF:Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1

ESE:Exonic splicing enhancer

FAT: Focal Adhesion Targeting

FEN 1:Flap structure-specific endonuclease 1

G:Guanina

GG-NER: Reparo por excisão de nucleotídeo do genoma global

GWA: Genome wide association (associação genômica ampla)

Gy: Grays

H AJ: Hospital Araújo Jorge

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HR: Homologous recombination

HT: Hormonioterapia

HUS1: HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)

IMC: Índice de Massa Corporal

IMRT: Intensity modulated radiotherapy

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: Quilo daltons

KU70: proteína codificada pelo gene XRCC6 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6)

KU80: proteína codificada pelo gene XRCC5 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5)

LIG4: ligase IV, DNA, ATP-dependent

MDM2: Murine double minute 2

MeV: Mega elétronvolt

MLH1: MutL homolog 1

MLH3: MutL homolog 3

MMR: MisMatch Repair

MRE11 Meiotic recombination 11 homolog A

mRNA: Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucléico mensageiro)

MSH2: MutS homolog 2

MSH3: MutS homolog 3

MSH6: MutS homolog 6

mV: miliVolt

NBS1: Proteína codificada pelo gene NBN (Nibrin)

NER: Nucleotide Excision Repair

NHEJ: Non-homologous recombination end-joining

NLS: Nuclear localization sinalization

OMS: Organização Mundial da Saúde

OR: Odds ratio

P21: Proteína p21

P53: Proteína p53

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PI3/PI4: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIN3: Polimorfismo no íntron 3

PMS1: Postmeiotic segregation increased 1

PMS2: Postmeiotic segregation increased 2

PNK: ATP-dependent polydeoxyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase

Pro: Prolina

QT: Quimioterapia

RAD1: Restriction site associated DNA homolog1

RAD17: Restriction site associated DNA homolog17

RAD9: Restriction site associated DNA homolog9

RAD50: Restriction site associated DNA homolog50

RAD51: Restriction site associated DNA homolog51

RFC: Replication factor C

RNA: Ribonucleic acid

RPA: Replication protein A

RT: Radioterapia

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

SDSA: Synthesis-Dependent Strand Annealing

Ser: Serina

Sítio AP: Sítiosapurínico/apirimidínico

SMC1: Structural maintenance of chromosomes protein 1:

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TCR: Transcription coupled repair

TP53: tumor protein p53 gene

UV: Ultra-violeta

XPA:Xeroderma pigmentosum, complementation group A

XPB: Xeroderma pigmentosum, complementation group B

XPD: Xeroderma pigmentosum, complementation group D

XPG: Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G

XRCC4: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

Resumo

O propósito deste estudo foi avaliar a associação entre polimorfismos de base única nos genes ATM e TP53 em pacientes com câncer de mama e a morbidade na pele após a radioterapia. Estes dois genes codificam proteínas importantes nas vias de reparo do DNA. Acredita-se que seus polimorfismos possam modificar a resposta do tecido normal a radioterapia. Foi selecionado um grupo de 78 pacientes do serviço de radioterapia do Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer em Goiás). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada a amostra de sangue periférico com subsequente extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os fragmentos gênicos de ATM e TP53. Finalmente, os fragmentos amplificados foram sequenciados para verificada presença da troca de G>A no códon 1853 do gene ATM e polimorfismos do gene TP53 (C>G no códon 72). Os efeitos adversos foram classificados de acordo com o escore do Radiation Therapy Oncology Group (RTOG). Por meio de uma análise univariada, os eventos esperados do tratamento com RT mostraram que houve uma associação significativa entre o reforço da RT e a sua suspensão com os efeitos agudos de alto grau da pele (OR=3.05, IC95% 1,175-7,928, $p=0,035$) (OR=3.808, IC95% 1,213-11,958, $p=0,033$), respectivamente. Os efeitos colaterais agudos de alto grau na pele se associaram a um tempo maior de duração de tratamento. ($p=0,01$ IC95% -11.546- (-1,638)). O tipo de cirurgia se associou significativamente aos efeitos colaterais tardios do tecido subcutâneo (OR=1,326, IC95% 1,143-1,537, $p=0,016$). Não houve associação entre os polimorfismos de TP53 e ATM analisados com os efeitos colaterais agudos e tardios de pele, nem tampouco do tecido subcutâneo(RTOG \geq 2) ($p>0,05$).

Palavras-chave: câncer de mama, radiotoxicidade, ATM e TP53.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms of ATM and TP53 genes in breast cancer patients with skin and subcutaneous systems morbidity after radiotherapy. These two genes encode important proteins of the DNA repair pathways. It is believed that their polymorphisms are likely to modify the response of normal tissues to radiation. A group of 78 patients of the Radiotherapy Service at Araújo Jorge Hospital (Associação de Combate ao Câncer em Goiás) was selected. After signing the informed consent agreement, a sample of peripheral blood was collected for subsequent DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for amplification of ATM and TP53 gene fragments. Finally the amplified fragments were sequenced to verify the presence of an exchange G> A in the codon 1853 of the ATM gene and polymorphisms of TP53 gene (C> G in the codon 72). The side effects were classified according to the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) score. On univariate analysis, the expected effects of treatment with RT events showed that there was a significant association between a boost RT and its suspension with the acute effects of high-grade skin (OR = 3.05, 95% CI 1.175 to 7.928, $p = 0.035$) (OR = 3.808, 95% CI 1.213 to 11.958, $p = 0.033$), respectively. Side effects of acute high-grade skin were associated with a longer duration of treatment. ($p=0.01$ IC95% -11.546 - (-1,638)). The type of surgery was significantly associated with late subcutaneous tissue (OR = 1.326, 95% CI 1.143 to 1.537, $p = 0.016$) side effects. There was no association between polymorphisms TP53 and ATM analysed with acute and late side effects of skin nor subcutaneous tissue (RTOG ≥ 2) ($p > 0.05$).

Keywords: breast cancer, radiation toxicity, ATM, TP53.

I - INTRODUÇÃO

1.1 –Dados gerais - Câncer de mama

O câncer permanece sendo um dos principais responsáveis pela morbimortalidade no Brasil. São estimados para 2014 cerca de 576 mil novos casos^[1]. Cerca de 52% dos casos de câncer (excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma) acometerão as mulheres em 2014^[1]. O câncer de mama é a quinta causa de morte por câncer em geral (458.000 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres^[2].

O grande responsável pelo acometimento do câncer no sexo feminino, continua sendo o câncer de mama, com um total estimado de 57.120 novos casos em 2014, correspondendo a 20,8% do número estimado de novos casos, com uma taxa de 56,06/100 mil habitantes^[1]. Na região Centro- Oeste são estimados 51,30 novos casos /100 mil habitantes, demonstrando que assim como na maioria do resto do país o câncer de mama é o mais incidente entre os indivíduos do sexo feminino (excluindo o câncer de pele não melanoma)^[1]. No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição. A taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 11,88 óbitos/100.000 mulheres em 2011^[3].

Os principais fatores de risco para o câncer de mama estão ligados a idade, aspectos endócrinos e genéticos^[4]. Menos de 1% de todos os cânceres de mama ocorrem em mulheres com menos de 25 anos. Após os 30 anos, há um nítido aumento na incidência da doença, que aumenta continuamente com a idade^[5]. Os aspectos endócrinos estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com aumento do risco quanto maior for o tempo de exposição. Possuem risco aumentado as mulheres com história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 8 anos), menopausa tardia (após os 50 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade e terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos.

Outros fatores incluem a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos, a ingestão regular de bebida alcoólica, mesmo que em quantidade moderada (30g/dia), obesidade, principalmente quando o aumento de peso se dá após a menopausa, e sedentarismo^[4]. A prática de atividade física e o aleitamento materno exclusivo são considerados fatores protetores^[6].

História familiar, principalmente em parentes de primeiro grau antes dos 50 anos, é importante fator de risco para o câncer de mama e pode indicar predisposição genética associada à presença de mutações em determinados genes. Entretanto, o câncer de mama de caráter hereditário corresponde a cerca de 5-10% do total de casos. Todos os genes herdados são autossômicos dominantes, mas têm penetrância variável. As mutações mais comuns são as deleções genéticas do BRCA1 (cromossomo 17q21) e BRCA2 (cromossomo 13q12-13). As portadoras dessas mutações têm um risco de 4% ao ano de desenvolver a doença e de até 85% ao longo de toda a vida, além do risco de 65% de desenvolver câncer na mama contralateral^[7].

O câncer de mama, identificado em estágios iniciais, quando as lesões são menores de dois centímetros de diâmetro, apresenta prognóstico mais favorável e elevado percentual de cura. Na maioria das vezes, o câncer de mama surge no quadrante superior externo, onde a proporção de tecido mamário é maior. A mamografia e o exame físico são as modalidades de rastreio clássicas e se complementam. Cerca de 10 a 50% dos cânceres detectados por mamografia são impalpáveis, enquanto o exame físico detecta 10 a 20 % dos cânceres não observados radiologicamente^[8]. O exame clínico das mamas (ECM) deve ser realizado a cada três anos entre os 20 e 40 anos, e depois anualmente^[9]. Sua eficácia depende da qualidade com a qual é realizado, mesmo que realizado por pessoal paramédico^[10]. A recomendação para as mulheres de 50 a 69 anos é a realização da mamografia a cada dois anos e do exame clínico das mamas anual. A mamografia nesta faixa etária e a periodicidade bienal é a rotina adotada na maioria dos países que implantaram o rastreamento organizado do câncer de mama e baseia-se na evidência científica do benefício desta estratégia na redução da mortalidade neste grupo. Segundo revisões sistemáticas recentes, o impacto do rastreamento mamográfico na redução da mortalidade por câncer de mama pode chegar a 25%^[11,12,13]. Para as mulheres de 40 a 49 anos, a recomendação é o exame clínico anual e a mamografia diagnóstica em caso de resultado alterado do ECM. Segundo a OMS, a inclusão desse grupo no rastreamento mamográfico tem hoje limitada

evidência de redução da mortalidade^[2]. Uma das razões é a menor sensibilidade da mamografia em mulheres na pré-menopausa devido à maior densidade mamária.

Para as pacientes de alto risco a recomendação para o rastreamento se inicia aos 35 anos, com exame clínico das mamas e mamografia anuais^[14]. Segundo o Consenso de Mama, risco elevado de câncer de mama inclui: história familiar de câncer de mama em parente de primeiro grau antes dos 50 anos ou de câncer bilateral ou de ovário em qualquer idade; história familiar de câncer de mama masculino; e diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular in situ^[14]. O diagnóstico definitivo é dado pelo exame histopatológico, que deve conter características da neoplasia que influenciarão no prognóstico e na terapia a ser adotada.

O tamanho do tumor é a medida dada pelo maior diâmetro do componente invasor (sempre confirmada à microscopia). Se o tumor for multifocal ou multicêntrico a medida é dada pelo maior tumor^[15]. O tipo histológico segue a padronização da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Armed Forces Institute of Pathology (AFIP)^[15], destacando-se a identificação do subtipo especial puro (mais de 90% do componente especial) que tem melhor prognóstico. O grau histológico é definido utilizando o grau de Nottingham, que inclui:

- Percentual de diferenciação tubular;
- Avaliação do pleomorfismo nuclear;
- Índice mitótico^[15].

Na peça do exame ainda é definida a invasão peri-tumoral nos vasos sanguíneos ou linfáticos. O relatório deve conter o número de linfonodos dissecados (recomenda-se no mínimo 10); número de linfonodos comprometidos; tamanho do maior foco metastático, invasão capsular e extensão a tecidos extranodais e coalescência.^[15]

A avaliação das margens cirúrgicas de ressecção deve estar descrita e considera-se margem comprometida a presença de neoplasia na área pintada com tinta nanquim e no caso de margens livres determina-se em milímetros a distância da neoplasia a menor margem^[15]. Recomenda-se ainda a realização de pesquisa dos receptores de estrógeno e progesterona em todos os casos, e naqueles onde existam metástases axilares ou a distância realizar também a pesquisa do produto de

oncogene c-erbB-2.^[15]O estadiamento é baseado na classificação TNM (T: tumor, N: linfonodo e M: metástase) (**Anexo 1**).

As modalidades terapêuticas são a cirurgia e a radioterapia para tratamento loco-regional, e a quimioterapia e a hormonioterapia para tratamento sistêmico^[15].A cirurgia pode ser conservadora: tumorectomia (exérese do tumor sem margens)ou setorectomia (exérese do tumor com margens) ou não conservadora: adenomastectomia subcutânea (retirada da glândula mamaria, preservando-se pele e o complexo aréolo-papilar –CAMP); mastectomia simples ou total (retirada da mama com pele e o CAMP); mastectomia radical modificada (mastectomia com preservação de um ou dois músculos peitorais com linfadenectomia axilar) e a mastectomia radical(mastectomia com a retirada dos músculos peitorais e linfadenectomia axilar).^[15]

1.2 - Radioterapia para câncer de mama

Em todas as pacientes que foram submetidas a cirurgia conservadora, independentemente do tipo histológico, idade, uso de quimioterapia e/ou hormonioterapia e mesmo com margens cirúrgicas livres está indicada a Radioterapia (RT)^[16]

Após a cirurgia não conservadora (mastectomia) existe a indicação de radioterapia adjuvante nas seguintes situações:^[17]

- Tumores maiores ou iguais a 5 cm
- Pele comprometida
- Grau III
- Dissecção axilar inadequada (menos de 10 linfonodos)
- Invasão extra-capsular linfonodal (mesmo em um único linfonodo)
- Margem comprometida (menor que 1cm)
- Quatro ou mais linfonodos comprometidos

O reforço da dose na área tumoral (“boost”) está indicado nas pacientes com menos de 50 anos, com mais de 25% de carcinoma ductal *in situ* na peça

cirúrgica, na presença de margens exíguas (menor que 1 cm), comprometidas ou desconhecidas e em tumores com alta agressividade local.^[18]

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais. A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes.^[19]

A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, bem como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada. O sucesso da radioterapia em erradicar tumores depende em parte da dose total de radiação dada ao paciente, que é limitada pela tolerância do tecido normal na região que está recebendo tratamento^[20].

Há dois objetivos para o uso da RT adjuvante após a mastectomia. O primeiro é reduzir o risco de recidiva locorregional (plastrão mamário e drenagem linfática periférica). O segundo objetivo é melhorar a sobrevida^[21]. As áreas que podem ser irradiadas no câncer de mama, com intenção curativa são: a mama residual, após cirurgia conservadora, ou o plastrão mamário, após mastectomia; drenagens linfáticas das fossas supra e infraclaviculares; linfonodos da axila e a cadeia mamária interna^[21]. A mama e o plastrão mamário são usualmente tratados com dois campos paralelos opostos, tangentes, de megavoltagem de baixa energia, tipo cobalto ou aceleradores lineares de 4 ou 6 MeV^[21]. O limite superior é o mais alto que a região axilar permitir (em geral, altura do primeiro espaço intercostal), no sentido de se incluir toda a mama. O limite lateral externo está na linha medioaxilar. No tratamento conservador a fossa supraclavicular quase nunca é irradiada. O limite interno está na linha média sobre o esterno. O limite inferior dos campos tangentes está 1 a 2 cm abaixo do sulco infra-mamário.^[21] A indicação de se irradiar as drenagens linfáticas é a mesma tanto nas cirurgias conservadoras quanto nas mastectomias. A presença de um único linfonodo comprometido é suficiente para irradiar a fossa supraclavicular homolateral^[15]. Na irradiação da fossa supraclavicular, o campo acaba incluindo o ápice da axila^[21]. Existindo-se acima de quatro linfonodos axilares comprometidos e em tumores centrais ou mediais, podem-se incluir os linfonodos da cadeia da mamária interna, principalmente nos três primeiros espaços intercostais, uma vez que a probabilidade de comprometimento é de 30%^[15].

Existe uma variabilidade inter-individual no desenvolvimento de reações adversas no tecido normal, decorrentes da radioterapia. Além de fatores como idade, e estilo de vida, as diferenças da resposta individual ao tratamento podem ser atribuídas a bases genéticas. Por exemplo, já foi demonstrado em alguns estudos que certas alterações genéticas podem prever o desenvolvimento de reações adversas à radioterapia para câncer de mama ^[22,23,24,25].

Portanto, o objetivo da radioterapia é efetuar controle local do tumor, preservando ao máximo os tecidos adjacentes. Ao longo de vários anos estudos foram realizados, com a finalidade de se obter uma dose efetiva para cada tumor com o menor envolvimento possível do tecido normal adjacente, evitando as chamadas reações adversas ao tratamento.

I.3 - Dano ao DNA e Vias de Reparo

O DNA está sujeito a uma série de danos. Entre eles os danos provocados pela radiação ionizante, que são responsáveis pela efetividade da radioterapia no combate às células tumorais. No entanto, todas as células expostas no campo de irradiação, sofrem com os mesmos. A presença destes danos nas células do tecido normal é responsável pela presença e intensidade dos efeitos colaterais observados nos pacientes tratados com esta modalidade terapêutica. Estes sintomas são produto do desequilíbrio entre os danos causados pela radiação à estrutura do DNA e a capacidade de reparo deste dano, que acredita ser individual e determinada geneticamente^[26]. O mau funcionamento do sistema de reparo do DNA pode resultar em acúmulo de lesões, determinando a morte celular, mutações ou instabilidade gênica^[27]. Quando pensamos na célula tumoral este é o efeito benéfico observado no tratamento radioterápico, no entanto, são estes mesmos eventos que são responsáveis pelos efeitos colaterais da radioterapia quando a radiação atinge o tecido normal adjacente ao tumor. Este mau funcionamento pode ser resultado de características genéticas individuais determinando o fenótipo de radiosensibilidade exacerbada observado em alguns indivíduos.

Sabe-se que o DNA não é estável e está sujeito à formação de lesões que alteram sua estrutura constituinte. Estas lesões podem ser causadas por agentes genotóxicos externos ou serem secundárias à formação de produtos lesivos do próprio metabolismo celular, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (radicais superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila), produtos da respiração celular^[27].

Todos os componentes primários do DNA podem ser lesados (bases, açúcares e fosfodiésteres), no entanto a lesão de base assume uma importância maior, pois ela contém os elementos informativos do código genético.

Dentre os tipos mais comuns de alterações químicas nas bases estão as mudanças tautoméricas, desaminação e perda de bases. As duas primeiras alteram a propriedade de emparelhamento das bases e a última determina a ausência de informação genética^[27].

A perda de bases ocorre em uma frequência estimada de 5000 bases por dia em uma célula humana, sendo que são mais frequentes em bases de purina,

mais instáveis, que as de pirimidina. O sítio onde a base foi perdida é denominado de sítioapurínico/apirimidínico ou sítio AP^[27].

Qualquer produto químico com potencial genotóxico pode determinar mudanças estruturais no DNA. Um exemplo são os agentes quimioterápicos, utilizados no tratamento do câncer, que interferem na síntese do DNA, determinando a parada da replicação de populações celulares que se dividem rapidamente, como as células tumorais. Estes agentes causam diferentes tipos de lesões à molécula de DNA, como *crosslinks* (ligações químicas cruzadas entre as fitas do DNA), que impede a separação das fitas, bloqueando por completo a duplicação e transcrição do material genético.

Os agentes físicos presentes no ambiente também podem ser genotóxicos, entre eles estão a luz ultravioleta (UV) e radiação ionizante (raios gama e raio X)^[27]. A radiação ionizante, princípio da radioterapia, pode causar alterações em todos os componentes celulares e induzir vários tipos de lesões no DNA. Este efeito pode ser direto ou indireto. Nos defeitos indiretos, várias moléculas constituintes da célula como água e íons, ao sofrerem ação da radiação produzem espécies reativas, que interagem com o DNA, determinando alterações em sua estrutura. No entanto o efeito mais danoso provocado no DNA celular é a quebra da fita dupla, um efeito direto da radiação ionizante^[27].

A luz UV é dividida em três bandas de comprimento de onda: UVA (400 a 320nm), UVB (320 a 290 nm) e UVC(290 A 100 nm), em escala crescente de energia. Quando o DNA é exposto a luz UV ocorre uma ligação covalente entre pirimidinas adjacentes formando dímeros de pirimidina, que determinam considerável perturbação na estrutura da molécula do DNA^[27].

Existem ainda alterações na sequência do DNA, que podem ocorrer como produto de erro no próprio metabolismo, durante processos fisiológicos, como duplicação e recombinação, e resultam no emparelhamento errado de bases nitrogenadas nas duas fitas do DNA (*mismatch*)^[27]. Todos estes erros levam a instabilidade genética e mutações e a sobrevivência da célula depende de um sistema de reparo eficaz, capaz de reconhecer e corrigir estes erros.

1.3.1- Mecanismo de reparo de DNA

De um modo geral, cada tipo de lesão requer um mecanismo de reparo específico. Como exemplo, lesões que causam maior distorção na dupla hélice são reconhecidas e reparadas pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *Nucleotide Excision Repair*)^[28], como no caso dos fotoprodutos de luz UV. Já lesões sutis, como pequenas modificações de bases induzidas por agentes oxidativos, são removidas pelo sistema de reparo por excisão de bases (BER, *Base Excision Repair*)^[29]. As quebras de dupla fita são lesões altamente tóxicas e são reparadas por vias dependentes de recombinação homóloga ou junção de extremidades^[30]. Porém, dependendo da natureza do dano, pode haver sobreposição de diferentes vias de reparo na remoção das lesões^[27].

Os principais mecanismos de manutenção do DNA em mamíferos podem ser divididos em quatro classes principais: reversão da lesão, excisão da lesão, recombinação homóloga e junção de extremidades.

1.3.2- Reversão da lesão

É um mecanismo simples, onde uma única enzima é capaz de reconhecer e reverter a lesão para o seu estado normal, como ocorre com as fotoliasas, que reconhecem e se ligam especificamente a lesões induzidas pela luz UV^[27]. Estas enzimas são capazes de quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas adjacentes, revertendo a lesão para o seu estado normal. Este sistema de reparo foi perdido ao longo da evolução da espécie humana^[27].

Na espécie humana, ocorre o sistema de reversão para a O-metilguanina, uma lesão altamente mutagênica, porque essa base errada se parecia erroneamente com a timina. Para esse reparo, a proteína O-metilguanina transferase remove o grupo metil não nativo da guanina e o transfere para uma cisteína interna. Neste processo, ocorre a inativação irreversível da enzima. E isto tem impacto clínico conferindo resistência de tumores aos agentes quimioterápicos metilantes, em células onde existe grande atividade da O-metilguanina transferase^[27].

1.3.3-Reparo por excisão

Esta modalidade de reparo atua removendo as bases lesadas do genoma e substituindo-as por sequências de nucleotídeos não alterados, pode ocorrer na base nitrogenada, no nucleotídeo, ou o reparo por emparelhamento errôneo^[27].

1.3.3.1-Reparo por excisão de bases (BER)

É a principal maneira de reparo nos danos nas bases nitrogenadas do DNA. As bases lesadas são removidas do DNA e a lacuna resultante pode ser preenchida através de dois mecanismos: a via curta, quando somente um nucleotídeo é repostado ou na via longa, quando dois a oito nucleotídeos são repostos^[29].

O metabolismo inicia-se com a DNA- glicosilase, uma enzima que reconhece e acomoda em sua cavidade interna a base lesada. Dentro da proteína a base é clivada do esqueleto do nucleotídeo através da hidrólise da ligação N-glicosil. Após a remoção da base há a formação de uma lacuna e sistema de reparo curto ou longo do BER, irá promover a substituição da base^[27].

1.3.3.2-Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

É o tipo de reparo mais versátil e flexível, lida com uma variedade de lesões estruturalmente não relacionadas^[27]. Existem duas subvias com especificidade distinta de substrato: o NER de genoma global (GG-NER), que remove as lesões no DNA como um todo, e o reparo acoplado à transcrição (TCR), que remove as lesões presentes em genes ativos. Assim, lesões presentes na fita transcrita dos genes são reparadas preferencialmente em relação àquelas presentes nas não transcritas^[28].

As lesões são reconhecidas e há a formação de um complexo contendo DNA relaxado, resultado da ação das proteínas XPB e XPD (que tem ação de DNA helicase), que abrem cerca de 30 pares de bases ao redor da lesão^[27].O

posicionamento correto e a estabilização do complexo enzimático ao redor da lesão são obtidos a partir da ação da XPA, que busca por estruturas anormais no esqueleto do DNA^[27]. Após a lesão ser demarcada, o DNA é clivado dos dois lados da lesão por endonucleases específicas: XPG (incisão 3') e ERCC1-XPF (incisão 5'). Após a clivagem, a maquinaria de síntese do DNA, constituída pela DNA polimerase δ e fatores de processividade RFC e PCNA, são recrutados e iniciam a polimerização do novo fragmento, empregando como molde a fita não lesada.

1.3.4-Reparo de emparelhamento errôneo (MMR)

Mecanismo fundamental para a manutenção da fidelidade genética, pois se o erro não for corrigido antes de uma nova replicação, será fixado como uma mutação.

As regiões de microssatélites altamente repetidas estão espalhadas pelo genoma e são um desafio para a DNA polimerases, que frequentemente adicionam ou excluem nucleotídeos na nova fita de DNA (*missmatch*). O acúmulo destas alterações gera instabilidade genética, culminando no desenvolvimento de processos tumorais^[27].

O início do processo requer o reconhecimento das bases desemparelhadas pelo heterodímero composto de três homólogos de MutS: MSH2, MSH3 E MSH6^[27]. A etapa seguinte requer a interação dos homólogos de MutS e MutL para ativar os eventos de reparo subsequentes. Quatro homólogos para MutL foram descritos em mamíferos: MLH1, PMS1, PMS2 e MLH3^[27].

As etapas subsequentes: excisão da fita de DNA que carrega a base errônea, ressíntese e ligação ainda não são bem compreendidas e várias proteínas estão implicadas neste processo, incluindo polimerases e proteínas acessórias (RPA, PCNA, RFC, exonuclease 1 e endonuclease FEN1)^[27].

1.3.5- Reparo de quebras de dupla fita no DNA

Diferentes agentes podem levar à geração direta de quebras duplas do DNA, incluindo a radiação ionizante e as espécies reativas de oxigênio, que podem ser subprodutos da ação da própria radiação ionizante. Se não reparadas ou se reparadas de maneira insatisfatória as quebras duplas podem resultar em morte celular ou rearranjos cromossômicos, que, por sua vez, levam a instabilidade genética aumentada^[27].

O complexo MRN(MRE11-RAD50-NBS1) funciona como um sensor de quebras duplas que se acumulam no DNA. A quinase/treonina ATM também chega rapidamente aos sítios que contém essas quebras, associando-se em seguida com o complexo MRN, através da sua interação com NBS1. A proteína ATM está relacionada à 3-fosfatidilinosito-quinase (da mesma família das proteínas ATR e DNA-PK_{cs}). Estas proteínas são cruciais no processo de sinalização de danos no DNA^[31,32].

Tanto a localização da ATM em quebras duplas como a sua ativação completa são facilitadas pelo complexo MRN, que também parece servir de adaptador na fosforilação de alguns substratos da ATM^[27]. Um alvo crítico da ação da ATM é a proteína supressora de tumor p53. A p53 é ativada por diversos tipos de dano ao DNA e regula processos como o próprio reparo do DNA, a progressão do ciclo celular, a senescência e a apoptose^[27]. As células eucarióticas reparam quebras duplas através de dois mecanismos principais: reparo por recombinação homóloga e junção de extremidades não homólogas.

1.3.6-Reparo por recombinação homóloga (HR)

É um mecanismo bastante complexo com uma grande quantidade de proteínas e atividade enzimáticas envolvidas, porém os mecanismos não são completamente estabelecidos^[33,34]. Nesta modalidade de reparo, utiliza-se de uma cromátide irmã não danificada como molde, por esse mesmo motivo é restrita as fases S tardia e G2 do ciclo celular.

A via de reparo é iniciada com a remoção de DNA adjacente da quebra dupla no sentido 5´-3´, gerando assim porções de DNA fita simples com terminações 3´livres. A proteína RPA, com alta especificidade para DNA fita simples recobre o mesmo e remove a sua estrutura secundária^[27].

Em etapa subsequente, a proteína RAD51 liga-se ao DNA fita simples mantendo-o estendido e dirige a ponta 3´ sobressalente a procurar, invadir e parear com sequencias homólogas não danificadas, facilitando o processo de recombinação^[27]. Quando a homologia é encontrada, a fita invasora leva ao deslocamento de uma das fitas de DNA na cromátide irmã, formando a alça deslocada ou *D-loop*, a extremidade 3´ é utilizada para iniciar a síntese de DNA, que prossegue além do sitio original da quebra, restaurando a informação da sequência perdida^[27]. O *D-loop* é desfeito e a fita invasora é liberada e pode re-anelar com o local da quebra. Este processo pode ocorrer de duas maneiras diferentes: sem a participação da segunda ponta quebrada (*SDSA*, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*), ou com a participação da mesma através da invasão independente da segunda ponta ou por anelamento de DNA com a fita invasora (*DSBR*, *Double Strand Break Repair*). Dependendo da forma como são clivadas as junções no processo *DSBR*, podem gerar produtos com ou sem *crossover*^[27].

1.3.7-Reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ)

É uma via de reparo menos precisa que o reparo HR, na qual as duas terminações das moléculas de DNA quebradas, se não compatíveis, são processadas e ligadas diretamente^[35]. O processo é iniciado com a ligação do heterodímero KU70-KU80 a cada uma das pontas da quebra, que tem afinidade grande por terminações livres de DNA^[27]. O complexo KU-DNA faz o recrutamento da subunidade catalítica da quinase de serina/treonina DNA-PK_{CS}, que uma vez ligada às pontas de quebra dupla são ativadas e levam a autofosforilação em *trans*. Isto leva a mudanças conformacionais na proteína que permitem o acesso de enzimas de processamento e ligases ao DNA quebrado^[27].

Na maioria dos casos, as duas terminações de DNA não podem ser ligadas diretamente, pois possui uma região sobressalente que pode ser removida ou pode haver a síntese de DNA complementar, processo pelo qual participam várias enzimas como DNA polimerases μ e λ , transferase terminal de desoxinucleotídeos e a quinase polinucleotídica PNK^[27]. A ligação das terminações de DNA processadas é mediada por um complexo entre as proteínas DNA ligase IV e XRCC4^[27].

I.4 - Gene TP53

Uma das proteínas chave das vias de reparo do DNA é a proteína supressora de tumor p53 (**Figura 1**).



Figura 1. Estrutura da proteína p53, que consiste de 393 aminoácidos com 5 domínios bem definidos. O domínio de transativação, responsável pela ligação do MDM2. Um domínio rico em prolina, região altamente conservada. O domínio de ligação ao DNA. Um domínio de tetramerização, seguido por domínio básico não estruturado (Modificado do site http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)^[36]

O gene TP53 foi o primeiro gene supressor de tumor identificado. Está situado no braço curto do cromossomo 17(p13.1) (**Figura 2**). Trata-se de um gene altamente conservado, apresentando homólogos em diferentes espécies e codifica uma proteína nuclear com 53 kDa, denominada proteína 53 ou p53^[37].

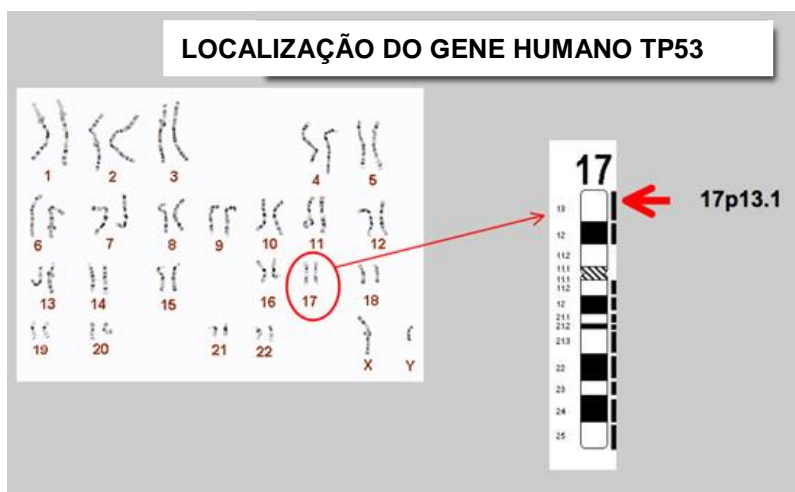


Figura 2.Localização cromossômica do gene TP53. O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossoma 17 (17p13), uma região que sofre deleção em cânceres humanos. (Modificado do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html)^[36].

Nos últimos anos, várias isoformas de p53 foram descritas. Já existe um total de 12 isoformas caracterizadas, que podem ter sido geradas a partir do *splicing* alternativo após a transcrição [38]. No entanto, o conhecimento a cerca das funções e atividades biológicas destas isoformas ainda é bem limitado. Novos estudos são necessários a fim de desvendar se existe uma relação destas isoformas de p53 com o prognóstico e tratamento do câncer. As isoformas descritas estão representadas na **Figura 3**:

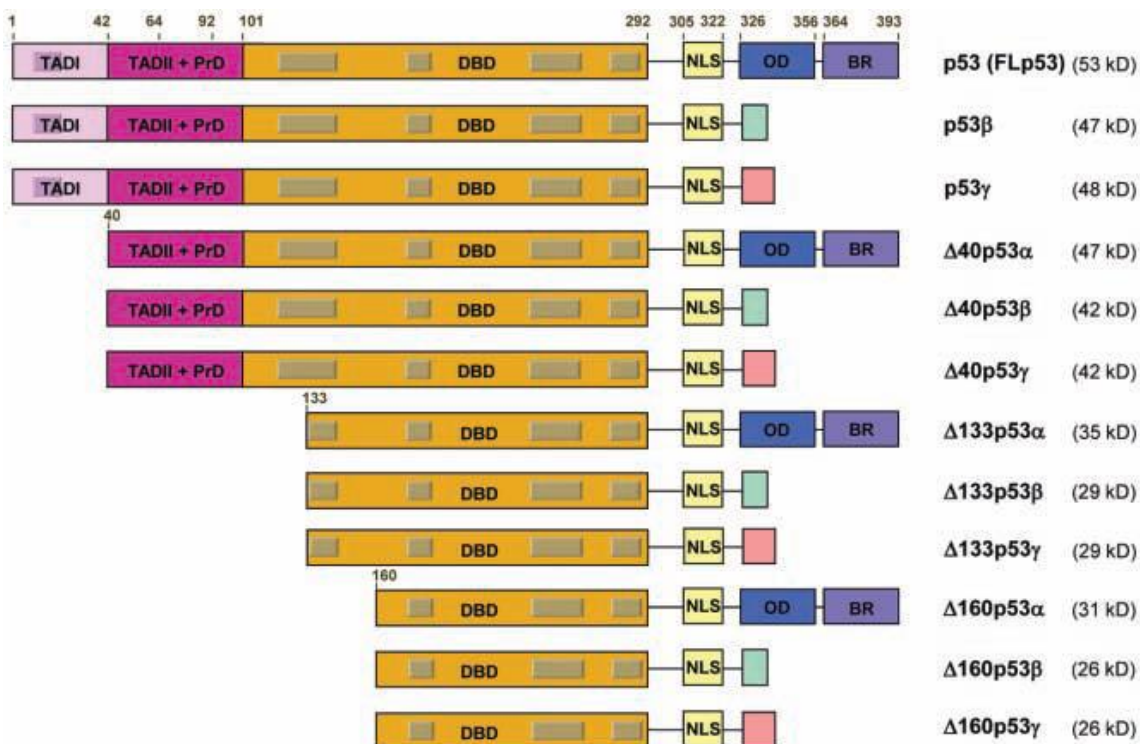


Figura 3. Representação esquemática das 12 isoformas de p53 humanas identificadas, com seus domínios e nomenclatura. TAD são domínios de transativação e DBD são domínios de ligação ao DNA. O domínio c-terminal compreende o sinal de localização nuclear (NLS), um domínio de oligomerização (OD) e uma região básica (BR). Os quadrados cinza representam 5 regiões altamente conservadas que definem a família de p53. Os domínios C-terminal de p53β (DQLTSFQKENC) e p53γ (MLLDLRWCYFLINSS) estão indicados pelos quadrados verde e rosa, respectivamente. O peso molecular de cada isoforma de p53 também está indicado [38].

A proteína supressora de tumor p53 responde a estresses celulares diversos regulando genes que induzem a parada do ciclo celular na fase G1/S, apoptose, senescência, reparo do DNA ou mudanças no metabolismo. A p53 também participa em outros pontos de checagem durante a fase G2 e mitose.

O DNA ao se expor à radiação ionizante altera sua cromatina. As proteínas sensoras (RAD9, RAD1, RAD17 e HUS1) reconhecem este dano e sinalizam para cinases, como a ATM, para que estas fosforilem e ativem a proteína p53. A p53 ativada atua em alvos em cascata, principalmente induzindo a transcrição do gene p21 que impede a célula de entrar na fase S, causando atraso no ciclo celular e permitindo o reparo do DNA. Ou, quando o dano ao DNA está além da possibilidade de reparo, encaminha a célula para apoptose (**Figura 4**).

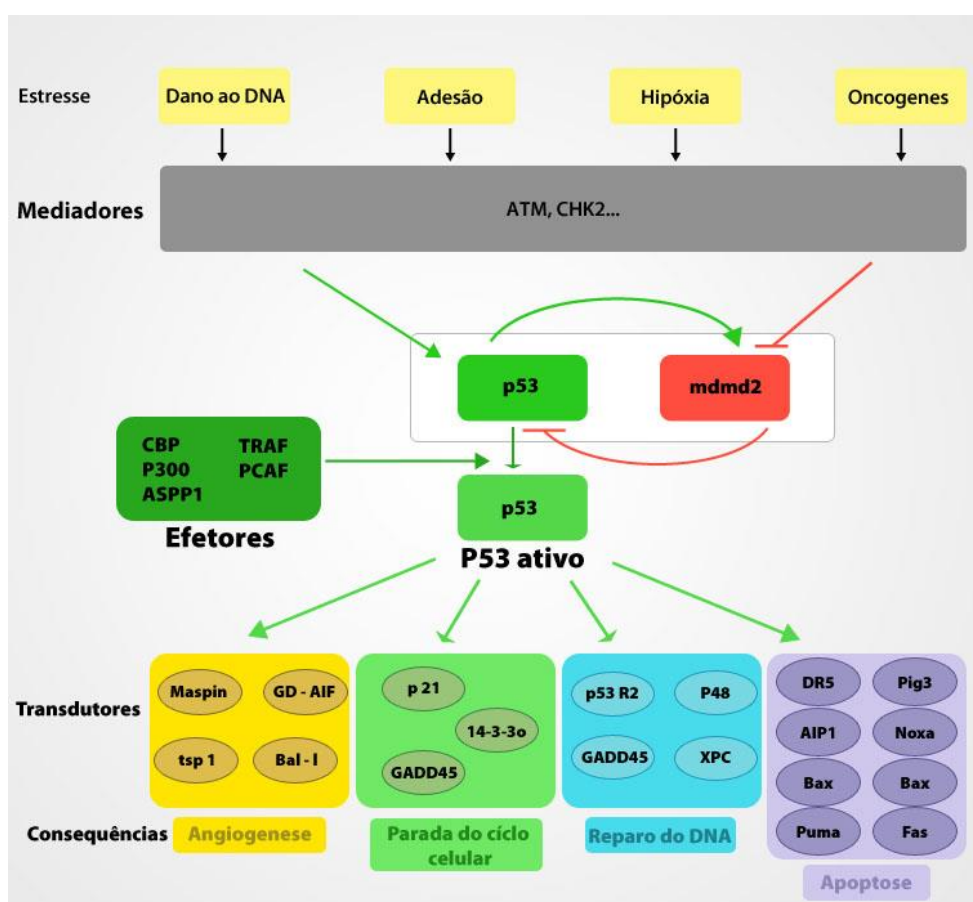


Figura 4. Esquema mostrando as vias de sinalização de TP53 e suas consequências assim como os genes envolvidos. (Modificado de: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)^[36].

A molécula Murine Double Minute-2 (MDM2) é um dos responsáveis pela regulação da degradação da proteína p53 através de via de ubiquitinação e também por bloqueio direto da atividade transcricional da p53 [39]. Quando submetidas a algum tipo de estresse, por exemplo, hipóxia ou radiação, a molécula de ATM pode fosforilar p53 e MDM2 aumentando assim os níveis de p53 como consequência da estabilização da proteína e também do aumento na sua síntese [40], permitindo atraso no ciclo celular (Figura 4).

I.4.1 Polimorfismos no gene TP53

Muitos polimorfismos foram identificados no gene TP53, sendo a maioria polimorfismos intrônicos, cujas consequências funcionais são ainda desconhecidas. Uma das variantes polimórficas mais bem estudadas, descrita em 1987 por Matlashewski e colaboradores, é a troca de Arginina (Arg) por Prolina (Pro) no códon 72 de p53 [41]. A proteína com Arg 72 se mostra mais eficiente ao induzir apoptose, do que a variante Pro72, provavelmente devido à melhor capacidade de interação com MDM2 [42].

Alguns estudos já demonstraram uma possível associação entre o polimorfismo no códon 72 de TP53 e o risco de desenvolvimento de certos tumores, tais como tumores endometriais, gástricos e de fígado em algumas populações [43-45]. No entanto, a mesma associação não foi obtida para tumores de próstata, cânceres cervicais e colorretais [46-48]. Quanto à associação entre o polimorfismo do códon 72 e o desenvolvimento de reação do tecido normal à radioterapia, apesar de fortes hipóteses, tem sido pouco investigada. Tan et al. (2006), demonstrou que tal polimorfismo pode estar relacionado às reações adversas agudas à radioterapia em pacientes com câncer de mama [49].

Além do polimorfismo do códon 72, existem outros polimorfismos de TP53 que vêm sendo investigados mais profundamente nos últimos anos. Um exemplo disso é o polimorfismo que ocorre no íntron 3, conhecido como TP53 PIN3 [50]. Este polimorfismo foi associado ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer de ovário e de câncer colorretal [51,52]. Outros polimorfismos foram descritos no

intron 3, entretanto não existem estudos que mostrem uma relação entre estes polimorfismos e o câncer.

I.5–Gene ATM

O gene ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*)^[53] foi primeiramente detectado em pacientes portadores da síndrome Ataxia-telangiectasia. A Ataxia-telangiectasia é uma desordem autossômica recessiva caracterizada por neurodegeneração, imunodeficiência, hipogonadismo, envelhecimento precoce, sensibilidade à radiação e suscetibilidade ao câncer. Os portadores possuem instabilidade genômica causada por uma resposta não efetiva as quebras de cadeia dupla do DNA, manifestada pela hipersensibilidade a radiação ionizante e por habilidade diminuída em ativar as vias de reparo celular^[54].

Localizado no cromossoma 11 (11q22.3) como mostrado na **Figura 5**, o gene ATM codifica uma proteína-quinase importante ponto de checagem do ciclo celular. Essa enzima faz parte da família de quinases PI3/PI4 e funciona como um regulador de outras proteínas, incluindo as proteínas supressoras de tumor p53 e BRCA1, a quinase de ponto de checagem CHK2, as proteínas de checkpoint RAD17 e RAD9 e as proteínas de reparo do DNA, NBS1 e SMC1. ATM e outra enzima da mesma família, ATR, são conhecidas como principais controladores dos pontos de checagem, durante a resposta celular ao dano do DNA e para manter a integridade do genoma humano. Danos do DNA levam a ativação de ATM que fosforila e ativa SMC1, que é crucial no controle da replicação celular e reparo após o dano do DNA^[55].

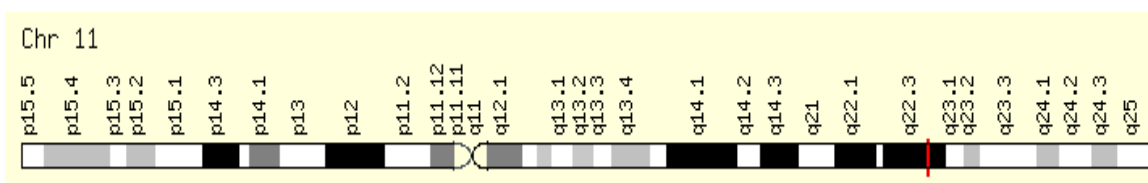


Figura 5. Localização cromossômica do gene ATM. Este gene localiza-se no braço longo do cromossoma 11 (11q22.3). Modificado do site: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=atm>^[56]

Em sua forma inativa a proteína de ATM é um dímero com peso molecular de cerca de 350KDa. Nesta configuração o domínio quinase de uma molécula é inativado pelo domínio FAT da outra. O domínio FAT (*focal adhesion*

targeting) é uma região de aproximadamente 500 aminoácidos, conservada entre as quinases da família PI3. Após a exposição à radiação ionizante ou outro tipo de agente que introduza quebras de dupla hélice no DNA, a proteína ATM responde com um rápido aumento de sua atividade quinase e simultaneamente é ativada por autofosforilação da serina na posição 1981 no domínio FAT, para que ocorra a dissociação da molécula em monômeros. Neste ponto a proteína atinge um tamanho de 370 KDa [57].

I.5.1 - Polimorfismos no gene ATM

Mais de 80 polimorfismos foram identificados no gene ATM, o que o torna um dos genes mais variáveis de todo o genoma humano^[58]. Um dos polimorfismos mais frequentes é o que ocorre no nucleotídeo 5557 correspondente ao exon 39 do gene (rs1801516). Caracteriza-se por uma troca de Guanina (G) por Adenina (A), o que resulta numa mudança do aminoácido Ácido Aspártico (Asp) para Asparagina (Asn) na posição 1853 da proteína (D1853N). Este polimorfismo afeta um “*exonic splicing enhancer* (ESE)”, sugerindo uma possível alteração no *splicing* do exon 39 do gene ATM e levando à produção de uma proteína menos efetiva^[59].

Estudos genéticos em pacientes com câncer de mama mostraram uma associação importante entre polimorfismos do gene ATM e o risco de desenvolvimento de reações adversas à radioterapia^[59, 60].

II - JUSTIFICATIVA

Trabalhos mostram que a hipersensibilidade à radioterapia observada em alguns indivíduos pode estar relacionada a fatores genéticos ^[61,62,63]. Um limitado número de estudos de coorte analisou a relação entre alterações genéticas e a radiosensibilidade de tecidos normais ^[64]. Até o momento, os dados disponíveis são insuficientes e o objetivo de explicar as bases genéticas da variabilidade das reações dos tecidos normais expostos à RT está longe de ser alcançado. ^[65, 66].

Por meio da biologia molecular, genética e radiobiologia clínica, Andreassen e colaboradores ^[26] levantaram a hipótese de que os efeitos colaterais intensos observados nos tecidos normais estariam associados a um “complexo traço-dependente” com múltiplos determinantes genéticos mínimos, e os polimorfismos de base única (SNPs) poderiam corresponder a parte destes componentes genéticos. Aquele autor tenta classificar estas variações genéticas em dois grupos: as que influenciariam a radiosensibilidade em todos os tecidos normais e outras que determinariam este efeito de forma diferente em determinados tipos de tecidos.

É relevante salientar que não existem muitos trabalhos sobre o assunto e nenhum envolvendo câncer de mama foi realizado ainda no estado de Goiás, mostrando que embora seja uma área de muita importância ainda é pouco explorada. O objetivo destes estudos e também do nosso seria traçar associações genéticas com os efeitos colaterais severos, podendo orientar a prática clínica diária, chegando a situação em que os pacientes que fossem geneticamente predispostos teriam a RT contra-indicada ou a sua dose total diminuída. Aqueles que tivessem um fenótipo radorresistente poderiam ter a dose da RT escalonada, aumentando a chance de resposta ao tratamento.

Com este tratamento individualizado pelo perfil genético do paciente, os efeitos colaterais da RT seriam menos severos assim como o impacto destes na vida do paciente. Além disso, aumentariam as chances de resposta do tumor à irradiação e teríamos um impacto econômico, com a diminuição de internações devidos aos efeitos colaterais da RT, gerando uma economia para o SUS, e desafogando os serviços de atendimento de alta complexidade, que na realidade da saúde brasileira, atendem uma grande demanda, porque integram a rede de atendimento de vários municípios e até mesmo, vários estados da federação.

III - OBJETIVOS

3.1 - Geral

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a relação entre o genótipo de paciente (polimorfismos de base única – SNPs – do gene p53 e do ATM) com câncer de mama e as reações adversas agudas e crônicas apresentadas pelas mesmas durante a radioterapia.

3.2 - Específicos

- 1- Verificar a frequência de polimorfismos de base única dos genes TP53 (P72R) e ATM (D1853N) em pacientes com tumores de mama;
- 2- Verificar as possíveis associações dos polimorfismos estudados e as reações agudas e crônicas do tecido normal após a radioterapia de pacientes com câncer de mama;
- 3- Revisar e atualizar os principais estudos sobre a associação entre os genes TP53 e ATM com a toxicidade aguda e crônica em pacientes com câncer de mama tratadas com radioterapia;
- 4- Comparar os resultados obtidos com outros estudos; referente à associação de toxicidade à radiação com perfil genético de pacientes com câncer de mama tratadas com radioterapia.

IV - METODOLOGIA

4.1 - Seleção de pacientes

Para o estudo foram selecionados 78 pacientes do Serviço de Radioterapia, do Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). As informações clínicas dos pacientes foram coletadas a partir da revisão de prontuários e fichas de teleterapia do Serviço de Arquivo Médico do HAJ, da ACCG. Todas as pacientes selecionadas tiveram câncer de mama diagnosticado histologicamente e foram submetidas à radioterapia há pelo menos cinco anos. Os pacientes foram recrutados entre janeiro de 2009 e abril de 2012. A amostra de sangue periférico foi obtida após cada paciente ter concordado em participar do estudo e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 2**).

Todas as pacientes incluídas no estudo foram tratadas por radioterapia convencional (teleterapia), sendo a dose de radiação diária de 200cGy, totalizando 50 Gy de tratamento. O equipamento utilizado no tratamento foi o ALx1, Clinac 2100C/D (Varian Medical Systems) com fótons de energia de 15mV.

4.2 - Classificação da toxicidade

As reações adversas à radioterapia foram classificadas segundo critérios de escore de morbidade aguda e crônica do Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (**Anexo 3**)^[67]. Pacientes que desenvolveram reações adversas agudas ou crônicas classificadas com o escore de RTOG maior ou igual a 2 foram consideradas pacientes com efeitos adversos de alto grau.

4.3 - Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico histológico de câncer de mama.
2. Pacientes submetidos a radioterapia no HAJ, ACCG.
3. Assinatura do TCLE (Res. 196/96 e complementares, CNS).

4.4 - Critérios de exclusão

1. Pacientes com diagnóstico de carcinoma metastático.
2. Pacientes que evoluíram ao óbito até o momento da coleta da amostra.
3. Pacientes encaminhadas para radioterapia de serviços externos ao Hospital Araújo Jorge.
4. Pacientes com perda de seguimento deste hospital.
5. Pacientes que não concordaram em assinar o TCLE.

4.5 - Obtenção das amostras

Foram coletadas 78 amostras de 15 mL de sangue periférico heparinizado. Após a coleta, o material foi submetido à extração de DNA e armazenado em microtubos à -20°C.

4.6 - Extração de DNA

A extração de DNA a partir do sangue periférico coletado de cada paciente foi realizada com o equipamento e a tecnologia desenvolvidos pela Invitrogen

Corporation, CA. O kit *iPrep™ PureLink™ gDNA Blood* possui a tecnologia das *Dynabeads® MyOne™ SILANE* que são *beads* magnéticas monodispersas (1 µm) com uma superfície tipo sílica e uma área de superfície específica. A purificação do DNA da amostra foi obtida utilizando o procedimento de purificação baseado em *beads* e evitao uso de centrífugas e sistemas a vácuo, além de extrair 13 amostras em 30 minutos.

No processo totalmente automatizado, as células foram lisadas com o *Lysis Buffer* e as proteínas digeridas com proteinase K. O lisado foi misturado com *Dynabeads® MyOne™ SILANE* para subsequente ligação do DNA da amostra. O DNA ligado às *beads* magnéticas foi separado do lisado utilizando separação magnética. As *beads* foram lavadas exaustivamente com os tampões de lavagem para remoção dos contaminantes. O DNA genômico foi então eluído com tampão de eluição previsto no kit.

A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% e fotodocumentado pelo Molecular Imager Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories INC Latin America).

4.7 - Amplificação das regiões de TP53 e ATM

O SNP do códon 72 do gene TP53 ocorre no segundo nucleotídeo do códon e este se localiza na posição 466 do mRNA (2640nt). Para amplificação da região de interesse do gene TP53 (NM_000546) definimos um par de oligonucleotídeos. Usamos como *primer sense* a sequência 5' - ATGGAGGAGCCGCAGTCAGA - 3' (posição 10953-10972) e como *primer antisense* 5'- TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC - 3' (posição 11006-11025), gerando um fragmento de PCR de 527 pares de base (pb).

Os fragmentos de 527 pares de bases (pb) foram gerados a partir do DNA adicionado com uma *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA), a qual contém em sua mistura o tampão para PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA). Esta amplificação foi realizada com 1 ciclo de desnaturação a 95° C

por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95° C por 30 segundos, 61,3°C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto. Por fim, uma etapa de extensão final de 72° C por 7 minutos, sendo que após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C até o congelamento ou até a eletroforese.

O polimorfismo de base única do gene ATM ocorre com a substituição da guanina pela adenosina no 5557^o nucleotídeo do quadro de leitura aberto (posição 5942 do mRNA do gene ATM, pois o códon de iniciação do mRNA está na posição 386), levando a uma alteração na proteína com a troca do aminoácido ácido aspártico (Asp/D) pela asparagina (Asn/N) no códon 1853.

Para amplificação da região de interesse do gene ATM (NM_000051.3) definimos um par de oligonucleotídeos. Deste modo, utilizamos como *primer sense* a sequência 5' – AGCAGTATGTTGAGTTTATGGC - 3' (posição 81700-81721) e *primer antisense* 5'- TGAATCCAAGTTTGCAGG - 3' (posição 82003-82020), gerando um fragmento de PCR de 317 pares de base (pb).

Os fragmentos de 317 pares de bases foram gerados a partir de reação de PCR do DNA total do paciente utilizando a *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA), a qual contém em sua mistura o tampão para PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA). Esta amplificação foi realizada com 1 ciclo de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 94° C por 30 segundos, 54,3° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto. Por fim, uma etapa de extensão final de 72° C por 7 minutos, sendo que após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C até o congelamento ou à eletroforese.

Para avaliação dos amplicons, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As reações de PCR foram primeiramente submetidas à purificação pelo kit de purificação da Invitrogen™ e tratadas com o reagente ExoSAP-IT (Invitrogen, CA) para remover os dideoxinucleotídeos trifosfato (ddNTPs) e os oligonucleotídeos restantes da reação de PCR. Após a purificação, os fragmentos de interesse foram quantificados utilizando o bioanalisador de DNA Nanodrop (ThermoScientific, USA), para adequação da concentração de DNA de acordo com a exigência do kit de sequenciamento.

4.8 - Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram definidos oligonucleotídeos interno sense. Para o gene TP53 foi utilizado o *primer* interno com a seguinte sequência: 5' - ATGGGACTGACTTTCTGCT - 3' e para o gene ATM, o *primer* definido foi: 5'- TTGGGTGGATTTGTTTGT -3'. O kit de sequenciamento usado nas reações foi o BigDye Terminator v. 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), que fornece os componentes necessários para reação de sequenciamento em uma pré-mistura pronta, que deve ser adicionada juntamente com o produto de PCR purificado e *primer*. A reação de sequenciamento foi realizada com 1 ciclo de desnaturação a 96° C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 52,9° C para ATM e 55,3° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos. Após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C.

Antes da eletroforese capilar, as amostras foram submetidas à purificação utilizando o Kit de purificação BigDye X-terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) para remoção completa de ddNTPs, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, as amostras analisadas foram submetidas à eletroforese capilar no bioanalisador de DNA, ABI 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando polímero POP-7 para ABI 3130 e 3130xL (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados obtidos foram analisados pelo Software Seqscape v. 2.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Após o sequenciamento do fragmento dos genes TP53 e ATM, foi analisado o polimorfismo descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Polimorfismos dos genes TP53 e ATM

Gene	Exon	Descrição Genômica	Descrição do código	Descrição Protéica	Efeito	Referência
TP53	Exon 4	g.11446C>G	c.215C>G	p.P72R	<i>missense</i>	Mattashewski et al, 1987 ^[41]
ATM	Exon 39	g.86904G>A	c.5557G>A	p.D1853N	<i>missense</i>	Maillet et. al., 1999 ^[59]

4.9 - Análise estatística

A análise univariada da associação entre frequências alélicas dos SNPs e o grau de efeitos tardios foram medidos pelo odds ratio (OR) e o intervalo de confiança foi de 95%. Importância da OR foi avaliada pelo teste do qui-quadrado (χ^2). As variáveis quantitativas, tais como idade, seguimento pós RT em meses, dose de RT, dose de reforço, interrupção da RT em dias e duração da RT foram avaliadas pelo teste de t e a relação com efeitos colaterais da radioterapia. Um valor de p de 0,05 ou menor foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes utilizados. Análise de Kaplan-Meier foi utilizada para avaliar a relação potencial entre os efeitos tardios e tempo de seguimento dos pacientes. A análise estatística foi realizada utilizando a plataforma IBM SPSS Statistics (versão 22, SPSS Ciência, IL, EUA).

4.10 - Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás com protocolo CEP-ACCG Nº 035/07 de 27/09/2007 (**Anexo 4**).

V - RESULTADOS

As informações clínicas das pacientes selecionadas, como idade, comorbidades, tipo histológico do tumor, estadiamento clínico, histórico familiar de câncer, tipo de cirurgia, uso de hormonioterapia e de quimioterapia e os dados sobre a radioterapia foram revisadas retrospectivamente com base nas informações coletadas dos prontuários e ficha de radioterapia de cada paciente (**Tabela 2**).

Como mostra a **Tabela 2**, a média de idade das pacientes foi de 51,04 anos, variando de 32 a 81anos. Como a maioria das pacientes selecionadas tinham mais de 40 anos é comum a presença de comorbidades associadas. As principais comorbidades encontradas foram hipertensão arterial sistêmica em 31,2% das pacientes e diabetes mellitus em 5,3%. As collagenoses, que podem influenciar na incidência e na gravidade dos efeitos cutâneos da radioterapia, estavam diagnosticadas em 3 (4%) das pacientes que continham dados sobre estas doenças no prontuário.

Tabela 2 - Frequência das características clínicas das pacientes e do tratamento

Características	No. de pacientes (%)
Média de idade	51,05±10,24
Ca de mama na família	8 (10,3)
Ca em idade <40 anos e histórico familiar de câncer	17(21,8)
Hipertensão	24 (31,2)
Diabetes mellitus	4(5,3)
Outras comorbidades	6 (12,5)
Colagenoses	3 (4)
Hormonioterapia concomitante	19 (24,7)
Quadrantectomia	57(73,1)
Mastectomia	21(26,9)
Quimioterapia concomitante	28 (35,9)

Uso de antracíclico ou taxano pré-RT	43 (55,1)
Dose total de radiação Gy (média)	50,21 (45-50,4)
Duração do tratamento em meses (média)	61,5 (49-86)
Reforço RT	30(38,5)
Suspensão RT	19(24,4)
Seguimento em meses (média)	96,51±27,74
Desfecho sem evidencia de doença	65(85,5)

Abreviações: Gy: Grays, unidade de medida para dose de radiação, RT - radioterapia. * Média (faixa de variação) Ca: câncer,

Das 78 pacientes estudadas, 73,1% foram submetidas à cirurgia conservadora e 26,9 % à mastectomia. No momento da realização da radioterapia, 19 (24,7%) estavam realizando hormonioterapia, sendo o fármaco mais comumente utilizado, o tamoxifeno (77,6%). Entre as pacientes que utilizaram outras terapias associadas, foi observado que 35,9%, 28 pacientes, fizeram quimioterapia associado com a radioterapia, e mais da metade das pacientes avaliadas (55,1%) utilizaram como estratégia terapêutica a quimioterapia neoadjuvante contendo antracíclico ou taxano, que são quimioterápicos radiosensibilizantes (**Tabela 2**).

A dose total prescrita de RT foi 50,21± 0,9 Gy. Sendo que 30 (38,5%) pacientes necessitaram de dose de reforço da RT e 19 (24,4%) tiveram a radioterapia suspensa por algum motivo.

A maior parte dos pacientes (88,5%) tiveram o diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante, sendo três pacientes carcinoma lobular infiltrante, duas intraductal e quatro (5,1%) receberam o diagnóstico de carcinoma lobular e ductal infiltrante.

A resposta ao tratamento foi satisfatória na maioria das vezes. Após o término do seguimento, 65 (85,5%) das pacientes estudadas apresentavam-se sem evidências de doença. No entanto, 3 (3,8%) foram a óbito no período de avaliação e 8 (10,5%) tiveram metástases a distância diagnosticadas.

O **Gráfico 01**, mostra o percentual do número de pacientes em relação ao estadiamento clínico no momento do diagnóstico. A maioria das pacientes apresentavam os estadiamentos IIa e IIb.

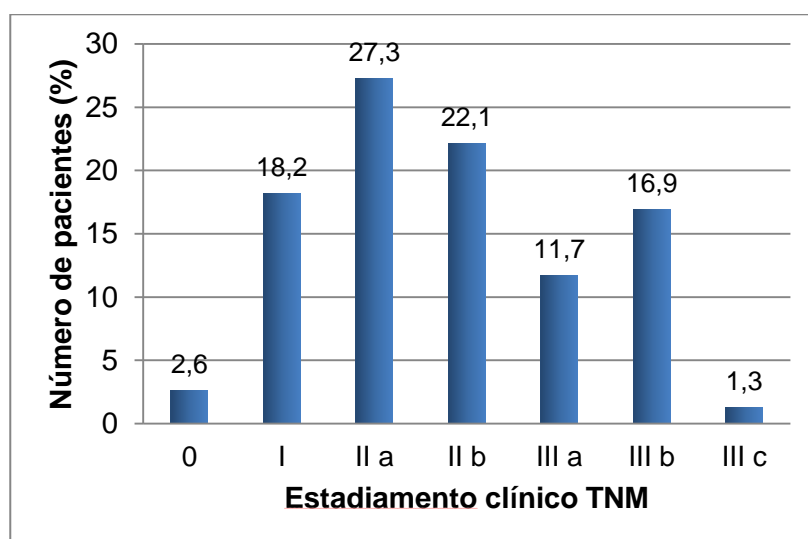


Gráfico 01 – Frequência das pacientes em relação ao estadiamento clínico no momento do diagnóstico.

Para a obtenção de resultados satisfatórios do presente estudo, a qualidade do ácido nucléico analisado foi de suma importância. A **Figura 6** mostra a integridade do DNA genômico de uma amostra representativa de 60 das 78 pacientes após a extração. Para tal verificação, uma alíquota de 2 μ l do produto da extração de DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

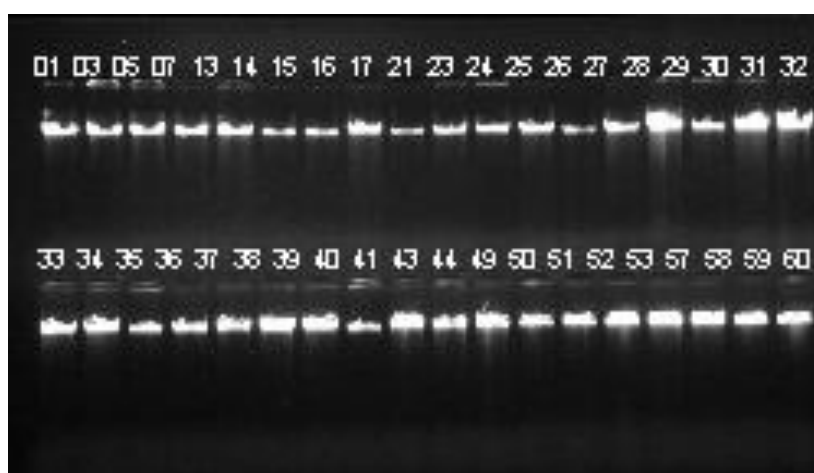


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a integridade do DNA genômico total extraído das amostras de 60 das 78 pacientes incluídos no estudo.

A partir de um DNA genômico de qualidade, o qual foi quantificado em bioanalisador Nanodrop (ThermoScientific), foi realizada a reação em cadeia da polimerase para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse dos gene TP53 e ATM. A **Figura 7** exemplifica o resultado da PCR para o fragmento de 527 pares de bases do gene TP53. Na **Figura 8**, podemos observar o resultado obtido para amostras de PCR do gene ATM com 317 pares de bases amplificadas. Os produtos de PCR também foram analisados em gel de agarose a 0,8%. As **Figuras 7 e 8** representam apenas alguns dos pacientes analisados, no entanto o resultado foi semelhante em todos os casos.

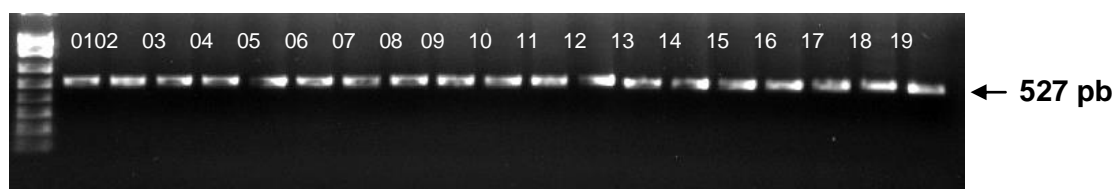


Figura 7. Análise eletroforética do fragmento amplificado do gene TP53 de 527 pares de bases. A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (Ladder 100 bp, Invitrogen™).

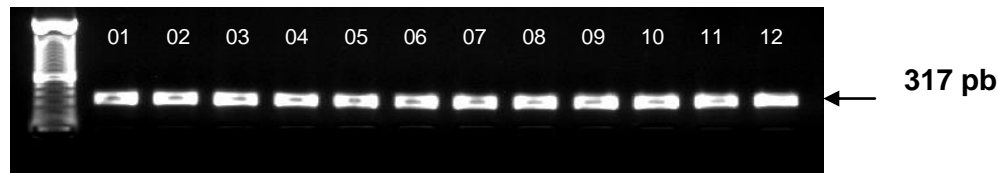


Figura 8. Análise eletroforética do fragmento amplificado do gene ATM de 317 pares de bases. A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (Ladder 100 bp, Invitrogen™).

A **Tabela 3** mostra as frequências de efeitos colaterais das 78 pacientes estudadas. Está representado o grau de toxicidade aguda e crônica para pele e apenas o grau de toxicidade crônica para o tecido subcutâneo (este tecido não apresenta efeitos agudos na classificação da RTOG). Os efeitos de alto grau são aqueles que tiveram $score \geq 2$ e os efeitos de baixo grau os que tiveram $score < 2$. Na prática clínica os efeitos de alto grau necessitam de tratamento medicamentoso para controle dos sintomas.

A **Tabela 3** também mostra que o número de pacientes que apresentaram morbidade aguda de alto grau e de baixo grau na pele foi o mesmo: 39 (50%). Havendo uma queda do número de pacientes quando se observa a incidência

de sintomas tardios de alto grau na pele e subcutâneo, respectivamente 10 (12,8%) e 14 (17,9%) pacientes.

Tabela 3. Morbidade segundo RTOG (grau de toxicidade)

	RTOG Pele aguda n (%)	RTOG Pele tardia n (%)	RTOG Subcutâneo tardia* n (%)
Alto grau	39 (50)	10(12,8)	14(17,9)
Baixo grau	39 (50)	68(87,2)	64(82,1)

Abreviações: RTOG = Radiation Therapy Oncology Group, Alto grau RTOG \geq 2; Baixo grau RTOG \leq 2, *Para análise dos efeitos tardios foram considerados pacientes com seguimento maior que 24 meses

As variáveis qualitativas foram associadas à presença de efeitos agudos na pele de alto grau (AG) e de baixo grau (BG), e estas associações encontram-se descritas na **Tabela 4**.

Nenhuma comorbidade analisada apresentou correlação estatística significativa com a presença de efeitos agudos de alto grau da RT na pele. O histórico de familiar de câncer, a realização de mastectomia, de quimioterapia ou hormonioterapia, seja neoadjuvante ou concomitante com a RT, também não mostraram associação com estes efeitos. Apenas a realização da dose de reforço de RT e a suspensão da RT tiveram associação estatística com a presença de efeitos agudos de alto grau ($p=0.035$; $p=0.033$). A presença dos SNPs avaliados para os genes TP53 (rs1042522) e ATM (rs1801516) não apresentaram associação estatística com a maior incidência de efeitos agudos de alto grau na pele e tecido cutâneo na amostra estudada.

Tabela 4 Associação dos efeitos agudos da RT na pele, com as variáveis clínicas e com a presença dos polimorfismos estudados.

	RTOG de pele aguda				
	AG n(%)	BGn(%)	OR	IC95%	Valor p
HAS	13(33.3)	11(28.9)	1.227	0,467-3,227	0,807
DM	4(10.3)	0(0)	2.057	1.662-2.609-	0,116
Colagenoses	1(2.6)	2(5.6)	0.447	0.039-5.157	0,605
Ca de mama na família	3(7.7)	5(12.8)	0.567	0.126-2.555	0.711
Pacte<40anos e/ou ca na família	8(20.5)	9(23.1)	0.869	0.293-2.524	1.000
Tipo de cirurgia	8(20.5)	13(33.3)	0.516	0.185-1.436	0,307
QT concomitante a RT	14(37.8)	14(37.8)	1.000	0.391-2.559	1.000
Antracíclicos ou taxanos pré RT	20(52.6)	23(62.2)	0.676	0.269-1.698	0.486
HT concomitante a RT	9(23.7)	10(25.6)	0.900	0.319-2.539	1.000
Reforço RT	20(51.3)	10(25.6)	3.053	1.175-7.928	0.035**
Suspensão RT	14(35.9)	5(12.8)	3.808	1.213-11.958	0.033**
TP53 genotype (rs1042522) GGxGC	35(87.2)	36(92.3)	0.567	0,126-2,555	0.711
ATM genotype (rs1801516) GGxGA	35(89.7)	35(89.7)	1.000	0,232-4,319	1.000

Abreviações: refSNP= Referência SNP cluster report; RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau RTOG; BG=Baixo Grau RTOG; OR= odds ratio; IC= Intervalo de Confiança; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; Ca=câncer; Pacte=paciente; QT=quimioterapia;RT: Radioterapia; HT:Hormonioterapia; DM=Diabetes mellitus

As variáveis quantitativas como idade e algumas características do tratamento também foram associadas com a presença de efeitos agudos da RT na pele. Estas associações e o poder estatístico das mesmas encontram-se descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Associação da idade e características do tratamento com a toxicidade aguda de pele

	RTOG de pele agudo	N	\bar{X} \pm SD	Valor p t-test	IC95%
Idade	BG	39	52.28 \pm 9.65	0.292	-2.154-7.077
	AG	39	49.82 \pm 10.78		
Seguimento pós-RT em meses	BG	39	98.15 \pm 25.22	0.601	-9.319-15.995
	AG	38	94.82 \pm 30.36		
Dose da RT (cGy)	BG	38	5035.26 \pm 29.20	0.175	-12.924-69.766
	AG	38	5006.84 \pm 124.53		
Dose de reforço (cGy)	BG	10	1182.00 \pm 209.86	0.257	-260.308-72.308
	AG	20	1276.00 \pm 209.52		
Interrupção RT (dias)	BG	5	19.00 \pm 14.14	0.173	-3.080-15.795
	AG	14	12.64 \pm 5.904		
Duração RT (dias)	BG	39	48.38 \pm 11.40	0.010**	-11.546- -1.638
	AG	38	54.97 \pm 10.40		

t-test para igualdade de médias, Abreviações: RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau

RTOG; BG=Baixo GrauRTOG, N- número de pacientes, \bar{X} média, SD desvio padrão, S_y Erro padrão da média; cGy=CentiGrays; RT:Radioterapia

A idade não mostrou estar associada à presença de radiosensibilidade de alto grau na pele, nas pacientes deste estudo. A realização da dose de reforço de RT mostrou ter associação positiva com os efeitos de alto grau, no entanto, a dose utilizada neste reforço não influenciou na presença dos mesmos. O número de dias que durou a RT esteve associado com efeitos de alto grau, mas a dose total da RT não mostrou esta associação. As pacientes que tiveram o tratamento interrompido em função do aparecimento de efeitos colaterais,tiveram a duração do tratamento estendida.

A presença dos polimorfismos analisados, mesmo em heterozigose, também não mostrou associação com a incidência dos efeitos tardios de alto grau da radioterapia na pele (**Tabela 6**). Diferentemente dos efeitos agudos a realização de reforço ou suspensão da RT não tiveram associação com efeitos tardios. Nenhuma outra variável qualitativa analisada mostrou associação estatística com a incidência destes efeitos tardios na pele, o que pode ser visto nos dados da **Tabela 6**.

Da mesma maneira observada quando foram avaliados os efeitos agudos na pele, a idade não mostrou associação com efeitos tardios de alto grau, bem como a maioria das características do tratamento (tempo de seguimento em meses, dose de RT, dose de reforço, número de dias de interrupção da RT). O número de dias da duração da RT não teve associação com efeitos tardios da pele, diferentemente dos efeitos agudos (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Associação das variáveis qualitativas com os efeitos tardios da radiação na pele

	RTOG de pele tardio				
	AGn(%)	BGn(%)	OR	IC95%	Valor p
HAS	4(40)	20(29.9)	1.567	0.398-6.160	0.493
DM	1(10)	3(4.5)	2.333	0.218-24.923	0.438
Collagenoses	1(10)	2(3.1)	3.500	0.287-42.639	0.353
Ca de mama na família	1(10)	7(10.3)	0.968	0.106-8.818	1.000
Pacte<40anos e/ou ca na família	1(10)	16(23.5)	0.361	0.042-3.071	0.306
Surgery type	5(50)	16(23.5)	3.250	0.834-12.667	0.122
QT concomitante a RT	3(30)	25(39.1)	0.669	0.158-2.830	0.733
Antracíclicos ou taxanos pré RT	5(60)	37(56.9)	1.135	0.292-4.410	1.000
HT concomitante a RT	3(30)	16(23.9)	1.366	0.316-5.909	0.701
Reforço RT	2(20)	28(41.2)	0.357	0.070-1.810	0.301
RT suspense	4(40)	15(22.1)	2.356	0.587-9.447	0.246
TP53 genotype (rs1042522) GGxGC	9(90)	61(89.7)	1.033	0.113-9.406	1.000
ATM genotype (rs1801516) GGxGA	9(90)	61(89.7)	1.033	0.113-9.406	1.000

Abreviações: refSNP= Referência SNP cluster report; RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau RTOG; BG=Baixo Grau RTOG; OR= odds ratio; IC= Intervalo de Confiança; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; Ca=câncer; Pacte=paciente; QT=quimioterapia; RT: Radioterapia; HT: Hormonioterapia; DM=Diabetes mellitus

Tabela 7 - Associação das variáveis quantitativas com os efeitos tardios da radiação na pele

	Pele tardia RTOG	N	$\bar{x} \pm SD$	Valor p t-test	IC95%
Idade	BG	68	50.69±10.57	0.422	-9.733-4.116
	AG	10	53.50±7.62		
Seguimento pós-RT em meses	BG	67	95.37±28,42	0.357	-27.479-10.025
	AG	10	104.10±22.43		
Dose da RT (cGy)	BG	66	5018.18±97.40	0.483	-83.538-39.901
	AG	10	5040.00±0.00		
Dose de reforço (cGy)	BG	28	1251.43±205.94	0.521	-217.894-420.75
	AG	2	1150.00±353.55		
Interrupção RT (dias)	BG	15	15.33±9.61	0.345	-5.661-15.328
	AG	4	10.50±3.51		
Duração RT (dias)	BG	67	51.93±10.96	0.566	-5.467-9.918
	AG	10	49.70±14.16		

t-test para igualdade de médias, Abreviações: RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau RTOG; BG=Baixo GrauRTOG, N- número de pacientes, \bar{x} média, SD desvio padrão, S_y Erro padrão da média; cGy=CentiGrays; RT:Radioterapia

O risco acumulado de ocorrência de efeito tardio na pele (RTOG) aumentou de acordo com o tempo de seguimento pós-RT, conforme mostra o **Gráfico 2**. As pacientes estudadas começaram a apresentar efeitos colaterais tardios de pele a partir de 50 meses de tratamento, com pico maior após 100 meses.

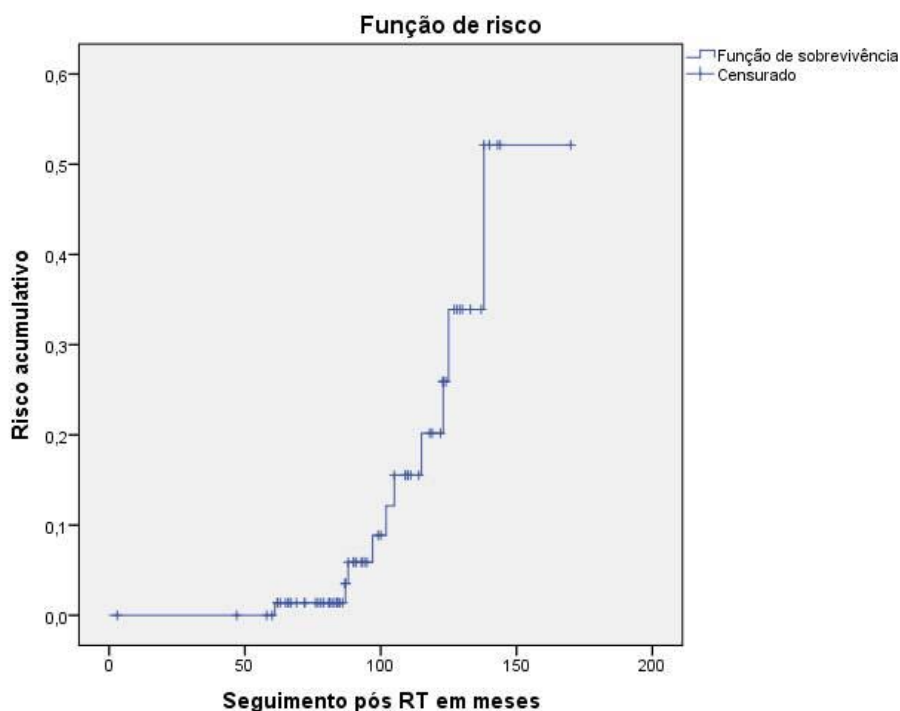


Gráfico 2- Risco de ocorrência de efeito tardio na pele (RTOG) alto grau e baixo grau.

Quando o acometimento do tecido subcutâneo (tardio) é levado em conta, a presença de comorbidades, histórico familiar, hormonioterapia, quimioterapia, reforço ou suspensão da RT não mostraram diferença estatística entre os grupos de pacientes que manifestaram lesões de alto ou de baixo grau.

Na comparação entre os tipos de cirurgia, as pacientes que foram submetidas à quadrantectomia apresentaram mais efeitos tardios no subcutâneo que àquelas submetidas à mastectomia, contudo tal fato pode estar relacionado a necessidade de realização de reforço em leito tumoral nas pacientes não mastectomizadas.

Das 14 pacientes que apresentaram lesões de subcutâneo classificadas como alto grau, 12 (85,7%) tiveram a presença do SNP (rs1042522) do gene TP53 detectada em homozigose ou heterozigose. No entanto, este achado não mostrou ter associação estatística significativa quando comparada à incidência deste SNP no grupo de pacientes que manifestaram lesões de baixo grau. O mesmo ocorreu quando analisamos o SNP (rs18014516) do gene ATM, que esteve presente em 100% das

pacientes que apresentaram as lesões de alto grau de subcutâneo, mas quando confrontado com as pacientes com manifestações de baixo grau, não mostrou associação significativa (**Tabela 8**).

Tabela 08- Associação das variáveis qualitativas com os efeitos tardios no subcutâneo da radiação

	Subcutâneo RTOG				
	AGn(%)	BGn(%)	OR	IC95%	Valor p
HAS	5(35.7)	19(30.2)	1.287	0.380-4.351	0.753
DM	2(14.3)	2(3.2)	5.000	0.640-39.059	0.152
Colagenoses	0(0)	3(4.9)	1.241	1.108-1.391	0.533
Ca de mama na família	2(14.3)	6(9.4)	1.611	0.289-8.968	0.629
Pacte<40anos e/ou ca na família	1(14.3)	15(23.4)	0.544	0.109-2.710	0.772
Tipo de cirurgia	0(0)	21(32.8)	1.326	1.143-1.537	0.016***
QT concomitante a RT	8(57.1)	20(33.3)	2.667	0.814-8.738	0.129
Antracíclicos ou taxanos pré RT	5(35.7)	38(62.3)	0.336	0.100-1.127	0.081
HT concomitante a RT	3(21.4)	16(25.4)	0.801	0.198-3.239	1.000
Reforço RT	5(37.5)	25(39.1)	0.867	0.260-2.886	1.000
RT suspense	4(28.6)	15(23.41)	1.307	0.358-4.774	0.735
Genótipo TP53 (rs1042522) GGxGC	12(85.7)	58(90.6)	0.621	0.112-3.455	0.629
Genótipo ATM (rs18014516) GGxGA	14(100)	56(87.5)	0.800	0.712-0.899	0.338

Abreviações: refSNP= Referência SNP cluster report; RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau RTOG; BG=Baixo Grau RTOG; OR= odds ratio; IC= Intervalo de Confiança; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; Ca=câncer; Pacte=paciente; QT=quimioterapia; RT: Radioterapia; HT:Hormonioterapia; DM=Diabetes mellitus

O tempo seguimento pós-RT em meses foi maior nas pacientes que manifestaram lesões de alto grau no subcutâneo com relevância estatística. As outras variáveis quantitativas não mostraram diferença estatística significativa quando

comparados os grupos que tinham manifestação de alto grau e de baixo grau, conforme tabela abaixo.

Tabela 9- Associação entre as variáveis quantitativas e os efeitos tardios da radiação no subcutâneo

	RTOG Subcutâneo	N	\bar{x} \pm SD	Valor p t-test	IC95%
Idade	BG	64	51.23 \pm 10.81	0.738	-5.034-7.074
	AG	14	50.21 \pm 7.35		
Seguimento pós-RT em meses	BG	63	92.24 \pm 26.49	0.006	-39.490- -7.462
	AG	14	115.71 \pm 25.82		
Dose da RT (cGy)	BG	62	5016.77 \pm 100.37	0.392	-76.95-30.504
	AG	14	5040 \pm 0.00		
Dose de reforço (cGy)	BG	25	1236.80 \pm 220.43	0.656	-261.765-167.365
	AG	5	1284.00 \pm 168.76		
Interrupção RT (dias)	BG	15	13.67 \pm 8.989	0.550	-13.750-7.583
	AG	4	16.75 \pm 8.958		
Duração RT (dias)	BG	63	51.43 \pm 11.27	0.735	-7.857-5.571
	AG	14	52.57 \pm 12.03		

t-test para igualdade de médias, Abreviações: RTOG=Radiation Therapy Oncology Group; AG=Alto Grau RTOG; BG=Baixo GrauRTOG, N- número de pacientes, \bar{x} média, SD desvio padrão, Sy Erro padrão da média; cGy=CentiGrays; RT:Radioterapia.

O risco acumulado de ocorrência dos efeitos tardios no subcutâneo aumentou com o tempo de seguimento pós RT, em especial após 60 meses, de modo semelhante ao que ocorreu com os eventos tardios de pele (**Gráfico 3**).

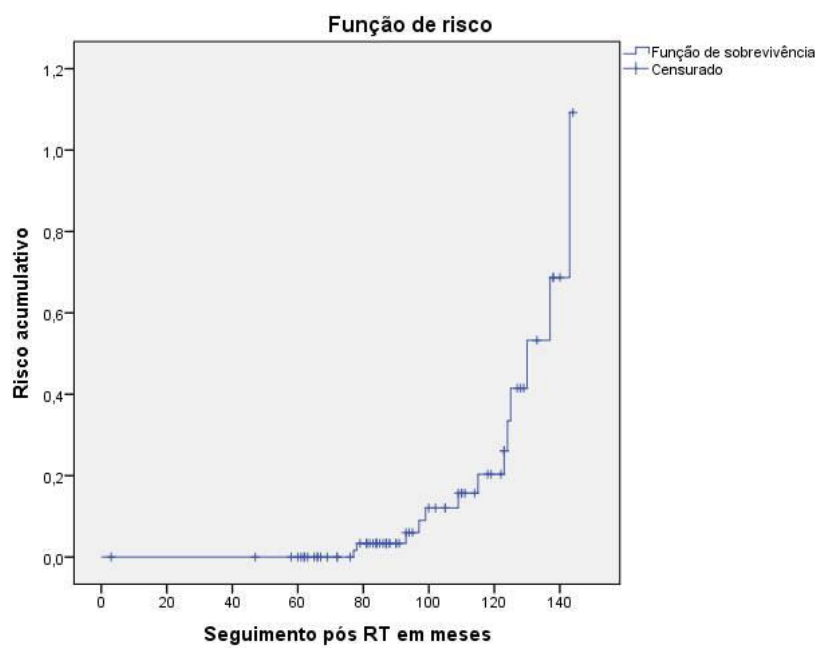


Gráfico 3- Risco acumulado de ocorrência do efeito tardio do subcutâneo

VI - Discussão

A principal contribuição deste estudo é ajudar de elucidar quais genes e quais polimorfismos estão ou não envolvidas no perfil de radiosensibilidade do tecido normal, buscando uma terapêutica individualizada de acordo com o perfil genético do paciente. Em 2002, Andreassen et al.^[26] hipotetizaram que a radiosensibilidade dos tecidos normais deve estar associada a um então chamado “complexo traço-dependente” que agrega o efeito de muitos determinantes genéticos mínimos, e os polimorfismos de base única (SNPs) poderiam corresponder a parte destes componentes.

Outros pontos abordados por este estudo puderam mostrar um sinal, na busca de identificação de fatores de risco para a maior incidência de efeitos agudos e crônicos da RT nas pacientes com câncer de mama. Já que estas pacientes têm sobrevida cada vez mais expressiva e esses efeitos devem ser evitados para diminuir a morbidade da radioterapia. Os efeitos tardios da RT são usualmente irreversíveis podendo diminuir a qualidade de vida das pacientes^[24].

A pele é um dos órgãos mais afetados pela ação da radiação ionizante no tratamento. No nosso estudo a incidência de efeitos agudos graves (score >2) foi de 50%. Em outro estudo, a incidência de efeitos colaterais de alto grau com necessidade de tratamento dos sintomas foi de 32%^[68]. Estas alterações afetam a auto-estima da mulher e tem impacto negativo na qualidade de vida das pacientes^[69,70].

Embora utilizasse uma classificação diferente para graduar o componente de fibrose no subcutâneo Zschenker et.al (2010) encontrou uma incidência de 24,2% de comprometimento deste tecido na série de 69 pacientes daquele estudo^[71]. No presente estudo, 14 pacientes (17,9%) apresentaram efeitos tardios em subcutâneo.

No mesmo estudo citado acima, não foi observada associação entre a idade e a presença de efeitos tardios no subcutâneo. A quimioterapia e a hormonioterapia, também não apresentaram associação com a incidência desse efeito colateral, dados que vão ao encontro dos observados por nós. O uso de quimioterápicos, a dose total e a presença de diabetes, também não mostraram associação com efeitos tardios em estudo de Ianuzzi et.al.(2002), que observou a prevalência de mutações do gene ATM associadas com os efeitos da RT em pacientes com câncer de mama^[72]. Este mesmo trabalho também teve como tipo histológico

mais incidente o carcinoma ductal infiltrante (83%) o que está de acordo com o dado das nossas pacientes, nas quais a proporção deste tipo foi em 88,5% dos tumores.

Quanto ao fato dos efeitos agudos de alto grau serem mais incidentes nas pacientes que receberam reforço da RT, acreditamos ser um efeito direto da maior exposição à radiação que estas pacientes foram submetidas. Da mesma maneira, a associação significativa entre a necessidade de suspensão no esquema da RT e a maior incidência de efeitos de alto grau, foi interpretada como viés, pois as pacientes que tiveram que ter as sessões suspensas são exatamente as que têm maior radiosensibilidade do tecido normal.

Os efeitos da radiosensibilidade são menores quando são utilizadas técnicas modernas de RT, como IMRT e a radioterapia em doses fracionadas^[71] Na nossa casuística observamos uma associação positiva entre o maior número de dias da RT e a maior incidência de efeitos agudos de alto grau, embora a dose total de radiação não variasse de maneira significativa entre os dois grupos. Analisando os casos, observou-se que as pacientes tiveram maior número de dias de duração da RT em consequência da presença dos efeitos de alto grau agudos, pois tiveram o tratamento temporariamente suspenso em função do aparecimento destes efeitos colaterais e conseqüentemente aumentaram a duração total em dias da RT.

Não encontramos na literatura consultada dados de associação entre a mastectomia e a incidência de efeitos tardios de baixo grau na pele. Em nossa amostra, houve uma diferença significativa na associação deste tipo de cirurgia e os efeitos de baixo grau quando comparados com os de alto grau. Acreditamos que esse fato possa estar associado com uma área maior ressecção da pele na cirurgia. Além disto, a cirurgia conservadora na maior parte dos casos necessita de dose de reforço de RT, e por este motivo estaria associada a maior incidência dos efeitos de alto grau.

Os Polimorfismos em TP53

Um dos objetivos maiores do nosso estudo era analisar a influência de polimorfismos genéticos nos genes TP53 e ATM e o desenvolvimento de toxicidade aguda ou crônica em pacientes portadoras de câncer mama tratadas com radioterapia convencional. Nossos achados mostraram que o polimorfismo P72R do gene TP53 não esteve associado ao desenvolvimento de efeitos colaterais de alto grau agudos e crônicos na pele e subcutâneo, embora o grupo de pacientes com efeitos colaterais de alto grau possa ser considerado pequeno em nossa amostra (10 para pele tardio e 14 para subcutâneo tardio).

O polimorfismo do TP53 P72R (Arg 72 Pro) determina uma proteína alterada, que foi relacionada com um aumento da apoptose. O genótipo 72Arg parece estar relacionado a uma maior incidência de apoptose, enquanto a forma 72 Pro induziria parada mais longa do ciclo celular em G1, permitindo maior ação do sistema de reparo do DNA^[73-75]. Sendo assim, a proteína p53 72 Pro, parece ser mais eficaz na ativação de genes alvos de reparação de DNA dependentes de P53, determinando à célula que contém esse genótipo maior capacidade de reparação do DNA^[76]., porém induz com menor eficiência a apoptose celular. A presença do polimorfismo P72R, tanto em homozigose quanto em heterozigose, poderia determinar menor eficiência na indução de apoptose das células lesadas pela radiação ionizante, que se reparadas de maneira incompleta determinariam com o passar do tempo maior incidência dos efeitos tardios cutâneos^[25], isto explicaria a maior incidência destes efeitos nos portadores deste polimorfismo, o que foi observado em alguns estudos citados abaixo. Em nossa amostra não houve associação significativa entre a presença de efeitos de alto grau seja agudos ou crônicos e a presença do polimorfismo.

Em um estudo de 2006 pesquisadores alemães mostraram que existe uma associação positiva entre a toxicidade aguda de pele e o genótipo 72Pro em pacientes obesas portadoras de câncer de mama, este trabalho contou com 77 pacientes para análise. Porém, para encontrar esta significância estatística as pacientes foram estratificadas de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), o que não ocorreu no nosso caso. Quando observadas as pacientes de maneira geral (sem estratificação do IMC) não houve associação significativa entre o desenvolvimento da toxicidade aguda e a presença do polimorfismo^[49]. Barnett et. al (2012,) analisaram o mesmo polimorfismo e também não encontraram associação positiva ($p=0.07$), entre a presença do polimorfismo e a incidência de efeitos agudos^[24].

Chang- Claude et. al. (2009) analisaram 131 pacientes com telangiectasia e 28 pacientes com fibrose e avaliou as variantes genéticas do TP53. Naquela amostra, as pacientes com o polimorfismo Arg72Pro estavam em risco aumentado de telangiectasia. A odds ratio (OR) foi OR=1,66, IC95% 1,02-2,72) para portadores 72Pro quando comparado com os não-portadores. Logo, essa variante modificou o risco de toxicidade cutânea tardia após radioterapia naquela amostra, o que não foi observado na nossa casuística^[25].

Embora existam dados que suportem a associação da presença do polimorfismo com os efeitos cutâneos crônicos, não conseguimos comprová-la no nosso estudo. O mesmo ocorreu com os efeitos agudos de alto grau da radioterapia,

cuja associação com a presença do polimorfismo permanece incerta na literatura disponível.

OPolimorfismo em ATM

As alterações no gene ATM são umas das mais estudadas para associação com a radiotoxicidade do tecido normal. Isto se deve a constatação de que pacientes com mutações neste gene apresentavam ataxia-telangectasia, uma alteração patológica que leva a uma hipersensibilidade à radioterapia, entre outras manifestações clínicas.

Nossas análises mostraram que o polimorfismo Asp1853Asn não estava associado ao desenvolvimento de nenhum efeito adverso agudo ou crônico de alto grau em pacientes portadoras de câncer de mama tratadas com radioterapia ($p>0,05$). O estudo de um único polimorfismo em ATM pode ter sido um dos fatores limitantes por não termos encontrado uma associação positiva entre as alterações no gene ATM e os efeitos adversos da radioterapia. Ianuzzi et. al. (2002) descreveram nove mutações no gene ATM que estavam associados a efeitos de alto grau em pele e subcutâneo, sendo que uma delas era classificada como sendo um polimorfismo (encontrado em menos de 1% da população)^[72].

Vários trabalhos foram publicados mostrando a associação entre polimorfismos de ATM e a fenótipo radiosensível para pacientes com câncer de mama tratadas com radioterapia. Alguns destes estudos mostraram que o polimorfismo no códon 1853 de ATM estava associado ao risco elevado de fibrose^[25,72,71,77]. Zschenker et al. observaram que o SNP em questão, tinha associação com a redução com o risco de fibrose^[71]. Esta mesma associação (redução do risco) foi encontrada por Angele et. al.^[23]. Todavia, outros autores observaram associação entre a presença do polimorfismo e o aumento no risco de fibrose^[25,78]. Em 2012, Tanteles et. al. publicaram um estudo que mostrou uma associação da herança do alelo rs1801516 e a presença de teleangectasia, um efeito tardio na pele^[22]. Uma questão importante levantada por eles é que as portadoras de mutações do gene ATM parecem ter aumento da incidência de câncer de mama, com taxa de portador de aproximadamente 3% entre as pacientes com este diagnóstico. Como as mutações do gene ATM poderiam ocorrer em diferentes haplótipos, eles sugerem a realização do sequenciamento do exoma, para determinar a relação causal entre o efeito e a natureza da variação do DNA, aumentando a força da associação entre a presença da radiosensibilidade e a presença deste polimorfismo^[22].

Os dados da literatura mostram que a presença do polimorfismo do códon 1853 pode estar associada tanto com o aumento dos efeitos colaterais cutâneos quanto com a diminuição destes, porém em nossa amostra não foi observada associação da presença dele com achados clínicos de alto grau na pele e subcutâneo.

Nem a homozigose nem a heterozigose para o polimorfismo analisado mostrou associação com efeitos agudos de alto grau nos nossos dados. Dados na literatura mostram que a heterozigose não é um fator preditor para o aumento significativo dos efeitos agudos, mas parece estar associada aos efeitos crônicos^[72]. Na casuística de Ho et. al.(2007), 15 pacientes eram heterozigotos para o SNP em questão, destas, 8 (53%) exibiram sintomas de radiotoxicidade tardia na pele grau 2 a 4. O odds ratio encontrado [OR=3,1; (IC95% 1,1-9,4)] mostrou que naquela população, a presença de polimorfismo foi considerada preditora dos efeitos adversos tardios, o que não foi observado no nosso estudo^[78]

Denham et. al. questionaram que uma das razões para que a radiosensibilidade celular de pacientes heterozigotos não se traduza necessariamente em radiosensibilidade clínica, seria o fato de que outros determinantes genéticos de toxicidade poderiam coexistir no mesmo paciente. Estes fatores determinariam um *down regulation* na fibrinogênese, determinando o acúmulo de fibrinogênio na matriz extracelular^[79].

O ATM é um gene grande com muitas variantes documentadas. Serão necessários estudos de associação destes SNPs em maiores grupos amostrais para estabelecer se as variantes de base única ou os haplótipos deste gene podem de fato contribuir com a toxicidade do tecido normal.

Limitações do estudo

Uma das grandes limitações deste estudo foi associar os efeitos da radiação no tecido normal apenas com o perfil genético das pacientes, uma vez que o serviço de radioterapia, no momento do tratamento das pacientes selecionadas, usava a radioterapia convencional e não a radioterapia 3D ou conformacional que estão associadas com menores taxas de efeitos colaterais. Este é definitivamente um parâmetro importante na comparação com estudos realizados em outros laboratórios e que utilizam tipos de tratamentos mais avançados.

Outra limitação importante deste estudo foi o tamanho do grupo amostral. Foram selecionados 78 pacientes para o estudo, o que em termos estatísticos é considerado um número pequeno. Portanto, os achados deste estudo necessitam de uma validação adicional por estudos subsequentes. Mesmo assim, nossos resultados puderam fornecer informações relevantes da importância do polimorfismo de TP53 e ATM, que permanecem incertos como determinantes de fenótipos de radiosensibilidade.

Nosso estudo foi realizado retrospectivamente com a coleta das amostras e dos dados dos prontuários após a radioterapia. Um estudo prospectivo poderia gerar mais informações sobre os pacientes e seus sintomas antes e após a radioterapia, além de ser possível estabelecer o risco relativo associado à presença dos polimorfismos estudados.

VII – Conclusões

- Não encontramos associação estatisticamente significativa entre a presença dos polimorfismos dos genes TP53 e ATM com as reações adversas agudas e crônicas à radioterapia em pacientes com câncer de mama
- A revisão da literatura mostra que os papéis destes polimorfismos permanecem incertos e o perfil genético da radiosensibilidade do tecido normal ainda necessita de estudos adicionais

Perspectivas

Os polimorfismos nos genes *ATM* e *TP53* são comumente estudados, principalmente por atuarem nas vias de reparo do DNA. No entanto, polimorfismos em outros genes são igualmente importantes no momento de avaliar a radiotoxicidade do tecido normal em pacientes com câncer de mama.

A identificação de polimorfismos associados às complicações da radioterapia pode levar a duas consequências importantes. A primeira é que com tal informação o clínico poderia tratar com cirurgia ou quimioterapia exclusivas àquelas pacientes que possuem genótipos associados aos efeitos adversos severos da radioterapia. Outra consequência diz respeito a pacientes que possuíssem SNPs associados ao dano pela radiação poderiam se beneficiar de radioterapias mais sofisticadas, como a radioterapia de intensidade modulada, em que o tumor é o foco da radiação e os tecidos adjacentes recebem quantidades de radiação inferiores, levando a menores danos. Desta forma, um teste genético preditivo poderia identificar pacientes que seriam beneficiados por tratamentos mais dispendiosos, gerando a economia para o sistema único de saúde. Um paciente que possua um SNP associado à toxicidade do tecido normal é de fato um candidato ideal para radioterapia, já que algumas variantes genéticas podem render radiosensibilidade ao tumor. Para tal paciente, o uso de uma dose padrão poderia ser desnecessariamente alta e é possível que este paciente possa ser curado com doses mais baixas, que levariam também a menos danos nos tecidos normais. Outro benefício é a possibilidade de tratar a grande maioria dos pacientes, que não possuam as alterações genéticas, com doses mais altas de radiação e melhorar suas chances de cura.

Atualmente a maior parte dos trabalhos neste campo foi realizada a partir de genes candidatos, como o presente estudo. Eles forneceram informações valiosas, no entanto são limitados e ainda não tiveram sucesso em fornecer um teste preditivo para identificar pacientes radiosensíveis. Para suprir o insucesso dos estudos com genes candidatos, os pesquisadores em radiogenômica começaram uma busca mais

ampla para identificar genes e SNPs associados à resposta a radiação. Já estão sendo executados projetos em larga escala de associação genômica ampla (GWA, do inglês: *genome wide association*), nos quais os pacientes são genotipados para um grande número de SNPs comuns. Estes estudos podem tanto servir como base para testes preditivos como podem também levar a descoberta de genes cujos produtos tenham um papel importante na resposta à radiação. Espera-se que estas informações ajudem a elucidar as vias envolvidas nos efeitos da radiação, o que poderia ajudar no desenvolvimento de drogas capazes de prevenir ou atenuar a toxicidade à radiação. Além disso, foi criado também um consórcio internacional de radiogenômica com a intenção de agrupar dados e amostras em escala global a fim de criar/compartilhar um grande biorrepositório juntamente com um banco de dados clínicos destes pacientes, que poderiam aumentar o poder estatístico dos estudos, nesta área ^[80].

Um grande desafio para o nosso grupo de pesquisadores é o de avaliar estes polimorfismos já associados à radiotoxicidade em pacientes de serviços de radioterapia a fim de validar estes resultados na população de Goiás, e futuramente, juntamente com outros serviços, validar os resultados também na população brasileira.

VIII –REFERÊNCIAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2008.
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 01/10/2013.
4. ADAMI H., HUNTER, D. e TRICHOPOULOS, D. (editores) Textbook of Cancer Epidemiology. 2nd ed.: Oxford University Press, 2008.
5. Anderson WF, Chu KC, Devessa SS. Distinct incidence patterns among in situ and invasive breast carcinomas, with possible etiologic implications. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88:149-159.
6. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Resumo. Alimentos, Nutrição, Atividade Física e Prevenção do Câncer. Uma perspectiva global. Tradução de Athayde Handson Tradutores. Rio de Janeiro, 2007, 12 p.
7. Greene MH, Genetics of breast cancer. *Mayo Clin Proc* 1997;72:54-65
8. Majid AS, de Paredes ES, Doherty RD, et al. Missed breast carcinoma: pitfalls and pearls. *Radiographics* 2003;23:881-895
9. Shapiro S, Smart CR, Costanza ME, Henson DE, Holleb AI, Hutter RV, et al. Guidelines for breast cancer screening. *Cancer* 1992; 69:2001-2.
10. Miller AB, To T, Baines CJ, Wall C. Canadian National Breast Screening Study-2: 13-year results of a randomized trial in women aged 50-59 years. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1490-9.
11. U.S. Preventive Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Task Force Recommendation Statement. *Annals of Internal Medicine*, 2009; vol.151 (10), pag. 716-724.
12. Gøtzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 4. Art.No.: CD001877. DOI: 10.1002/14651858.CD001877.pub2
13. AETMIS. Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé. Report prepared by Wilber Deck with the contribution of Ritsuko Kakuma. Screening mammography: a reassessment. Montreal: AETMIS, 2006. Disponível em internet: <http://www.aetmis.gouv.qc.ca/site/download.php?f=48202dfec055e10d2333f594c7d1b1b4>
14. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Controle do Câncer de Mama: Documento do Consenso. Rio de Janeiro, 2004.
15. Barros ACS, Barbosa EM, Gebrim LH, et al. Diagnóstico e Tratamento do câncer de Mama. Projeto Diretrizes, AMB CFM, 2001. Disponível em internet: <http://www.sbmastologia.com.br/arquivos/recomendacoes-do-consenso-8.htm>
16. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, et al. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1995; 333:1456-61.
17. Veronesi U, Salvadori B, Luini A, et al. Conservative treatment of early breast cancer. Long-term results of 1232 cases treated with

- quadrantectomy axillary dissection and radiotherapy. *Ann Surg* 1990; 211:250-9
18. Hammer J, Van Limbergen E. Consensus meeting on breast cancer: to boost or not to boost and how to do it. *Stresa: European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*;2001
19. Viani GA, Pellizzon AC, Guimarães FS, Jacinto AA, dos Santos Novaes PE, Salvajoli JV. High dose rate and external beam radiotherapy in locally advanced prostate cancer. *Am J Clin Oncol*, 2009 Apr; 32 (2); 187-90.
20. Burnet NG, Wurm R, Peacock JH. Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 1996 Sep; 70(3):289-300.
21. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SJ, et al. *Radioterapia em Oncologia*. Editora MEDSI, 1999-822
22. Tanteles G.A., Murray R.J.S., Mills J., Barwell J., Chakraborti P., Chan S., Cheung K, Dawn Ennis, Khurshid N., Lambert K., Machhar R., Meisuria M., Osman A., Peat I., Sahota H., Woodings P., Christopher J. Talbot, Symonds R.P., Variation in Telangiectasia Predisposing Genes Is Associated With Overall Radiation Toxicity, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, Volume 84, Issue 4, 15 November 2012, Pages 1031-1036,
23. S. Angele, P. Romestaing, N. Moullan et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity *Cancer Res*, 63 (24) (2003), pp. 8717–8725
24. Gillian C Barnett, Charlotte E Coles, Rebecca M Elliott, Caroline Baynes, Craig Luccarini, Don Conroy, Jennifer S Wilkinson, Jonathan Tyrer, Vivek Misra, Radka Platte, Sarah L Gulliford, Matthew R Sydes, Emma Hall, Søren M Bentzen, David P Dearnaley, Neil G Burnet, Paul DP Pharoah, Alison M Dunning, Catharine ML West, Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study, *The Lancet Oncology*, Volume 13, Issue 1, January 2012, Pages 65-77
25. J Chang-Claude, CB Ambrosone, C Lilla et al. Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer *Br J Cancer*, 100 (2009), pp. 1680–1686.
26. C.N. Andreassen, J. Alsner, J. Overgaard. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? *Radiation Oncol*, 64 (2002), pp. 131–140
27. Ferreira CG, Rocha JC (eds.) *Oncologia Molecular-2ª edição*, São Paulo, Editora Atheneu, 2010-61;81
28. Costa RM, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H e Menk CF The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimica et Biophys Acta* 85: 1083-1099, 2003.
29. Hedge ML, Hazra TK e Mitra S Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research* 18:27-47, 2008
30. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 18:134-47, 2008
31. Finkel E. Does cancer therapy trigger cell suicide? *Science*, 286; 2256-58, 1999.
32. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407:810-16, 2000
33. Li X, Heyer W. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cells Res*. 18:99-113, 2008
34. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 77:229-57, 2008

35. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cells Res.*18: 114-24,2008
36. The TP53 web site. [acesso em jan 2012]. Disponível em <http://p53.free.fr>
37. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986 Mar;320:84-5.
38. Khoury MP, Bourdon JC. P53 Isoforms: an intracellular microprocessor? *Genes Cancer.* 2011Apr;2(4):453-65.
39. Levav-Cohen Y, Haupt S, Haupt Y. MDM2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors.* 2005 Sep; 23(3):183-92.
40. Hall EJ, Giaccia AJ. *Cancer Biology. In: Radiobiology to the radiologist.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. cap. 17, p. 274-302.
41. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol.* 1987 Feb;7(2):961-3.
42. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar.;33(3):357-65.
43. Gu Y, Zhou X, Zhang SL. Meta-analysis of an association of codon 72 polymorphisms of the p53 gene with increased endometrial cancer risk. *Genet Mol Res.* 2011 Oct 31;10(4).
44. Chen X, Liu F, Li B, Wei YG, Yan LN, Wen TF. P53 codon 72 polymorphism and liver cancer susceptibility: a meta-analysis of epidemiologic studies. *World J Gastroenterol.* 2001 Mar;17(9):1211-18.
45. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010 Dec;14(6):829-33.
46. Li MS, Liu JL, Wu Y, Wang P, Teng H. Meta-analysis demonstrates no association between p53 codon 72 polymorphism and prostate cancer risk. *Genet Mol Res.* 2011 Nov;10(4):2924-33.
47. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port.* 2011 Jan-Feb;24(1):127-34.
48. Tang NP, Wu YM, Wang B, Ma J. Systematic review and meta-analysis of the association between p53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2010 May;36(5):431-8.
49. Tan XL, Popanda O, Ambrosone CB, Kropp S, et al. Association between TP53 and p21 genetic polymorphisms and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006 Jun;97:255-62.
50. Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene.* 1993 Jun;8(6):1703-5.
51. Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, Vesprini D, Abrahamson J, Lerman C, Godwin A, Moslehi R, Olipade O, Brunet JS, Stickeler E, Kieback DG, Kreienberg R, Weber B, Narod SA, Runnebaum IB. Intron variants of the p53 gene are associated with increase risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. *Br J Cancer.* 1999 Sep;81(1):179-183.
52. 48- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene.* 2004 Mar;23(10):1954-6
53. Savitsky K, Stez S, Tagle DA, Ziv Y, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* 1995 Nov;4:2025-32.

54. Lavin M. F, Delia D, Chessa L. ATM and the DNA damage response: workshop on ataxia-telangiectasia and related syndromes. *EMBO Rep*, 2006 Feb;7(2):154-60.
55. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica* 2008; 47: 809-24.
56. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=atm>
57. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003 Jan;421(6922):499-506.
58. Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, Chu G, Oefner PJ. Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):396-12.
59. Maillet P, Vaudan G, Chappuis P, Sappino A. PCR-mediated detection of a polymorphism in the ATM gene. *Mol Cell Probes*. 1999 Feb;13(1):67-9.
60. Angèle S, Falconer A, Edwards SM et al. ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer*. 2004 Aug;91(4):783-7.
61. Burnet NG, Peacock JH. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 2002 Mar;62(3):350-1.
62. Marcou Y, D'Andrea A, Jeggo PA, Plowman PN. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2001 Jul; 60(1):75-9.
63. Pugh TJ, Keyes M, Barclay L, et al. Sequence Variant Discovery in DNA Repair Genes from Radiosensitive and Radiotolerant Prostate Brachytherapy Patients. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug;15:5008-16.
64. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard M, Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 2003 Nov; 69(2):127-35.
65. Hendry JH. Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. *Radiother Oncol* 2001 May; 59(2):117-26
66. Raaphorst GP, Malone S, Alsbeih G, Souhani L, Szumacher E, Girard A. Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM radiosurgery. *Radiother Oncol*. 2002 Aug;64(2):153-6.
67. Cox JD, Stetz J, Pajak TK. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995 Mar;31(5):1341-6
68. Suesada, M.K., Impacto da radioterapia torácica na capacidade funcional de pacientes com neoplasia de mama. Tese de Doutorado da FMUSP, 2010, 50-55
69. Whelan TJ, Levine M, Julian J, Kirkbride P, Skingley P. The effects of radiation therapy on quality of life of women with breast carcinoma: results of a randomized trial. Ontario Clinical Oncology group. *Cancer* 2000; 88(10):2260-2266.
70. Lee TS, Kilbreath SL, Refshauge KM, Pendlebury SC, Beith JM, Lee MJ. Quality of life of women treated with radiotherapy for breast cancer. *Support Care Cancer* 2008; 16(4):399-405
71. Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, Borstelmann S, Szymczak S, Wellek S, Rades D, Hoeller U, Ziegler A, Dikomey E, Borgmann K. Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 2010 Oct ;97(1):26-32. doi:

- 10.1016/j.radonc.2010.01.016. Epub 2010 Feb 17
72. Christopher M Iannuzzi, David P Atencio, Sheryl Green, Richard G Stock, Barry S Rosenstein, ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, Volume 52, Issue 3, 1 March 2002, Pages 606-613, ISSN 0360-3016, [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)02684-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016(01)02684-0).
73. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*.1999;19:1092–1100.
74. Dumont P, Leu JI, Della PA, III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*.2003;33:357–365.
75. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer*. 2004;108:196–199.
76. Siddique M, Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*. 2006;25:3489–3500.
77. Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J et al. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after posmastectomy radiotherapy. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys*. 2006 Mar; 64:776-83.
78. A.Y. Ho, G. Fan, D.P. Atencio, S. Green, S.C. Froment, D.G. Haffty et al. Possession of ATM sequence variants as predictor for late normal tissue responses in breast cancer patients treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69 (2007), pp. 677–684
79.) J.W. Denham, M. Hauer-Jensen. The radiotherapeutic injury—a complex ‘wound’. *Radiother Oncol*, 63 (2002), pp. 129–145.
80. West C, Rosenstein BS, Alsner J et al.: Establishment of a Radiogenomics Consortium. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Apr; 76(5):1295–6.

IX – Anexos

Anexo 1 - Estadiamento de tumores de mama²

T-TUMOR	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: carcinoma intraductal e lobular in situ ou doença de Paget da papila sem tumor
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
	T1a- tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
	T1b-tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
	T1c- tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
	T4a-extensão para a parede torácica
	T4b- edema (incluindo peau d'orange)ou ulceração de pele da mama ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama
	T4c- T4a e T4b associados
	T4d- carcinoma inflamatório
N-LINFONODOS REGIONAIS	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por ex. foram removidos previamente)
N0	Ausência de metástase nos linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) móvel(is)
N2	Metástase nos linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou a outras estruturas
N3	Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral

M-Metástase à distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

Estadiamento do câncer de mama em função das diversas combinações possíveis pelo sistema TNM			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIa	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estadio IIIB	T4	qualquer N	M0
	qualquer T	N3	M0
Estadio IV	qualquer T	qualquer N	M1

Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH, et al. Diagnóstico e Tratamento do câncer de Mama. Projeto Diretrizes, AMB CFM, 2001. Disponível em internet: <http://www.sbmastologia.com.br/arquivos/recomendacoes-do-consenso-8.htm>

Número ficha: _____ CID: _____ Projeto: _____ Prontuário: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Esse consentimento é exclusivo para esta pesquisa, sem possibilidade de extensão do mesmo para outros projetos. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final este documento, que está em duas vias (uma da pesquisadora e a outra sua). Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge ou o Coordenador do Comitê de Ética pelo telefone (062) 3243-7000, ramal 7089.

O título da pesquisa é **“Predição da radiosensibilidade da pele e do tecido subcutâneo pela análise do polimorfismo dos genes p53 e ATM: avaliação prospectiva e retrospectiva de pacientes com câncer de mama submetidas à radioterapia”**.

As pesquisadoras responsáveis são a Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi e a Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares, que, em caso de dúvidas podem ser contatadas pelos telefones (062) 3243-7022/3243-7059. Sobre a pesquisa:

- Esse estudo se propõe a avaliar a variação dos efeitos colaterais secundários à radioterapia que a senhora recebeu ou irá receber. Para isso utilizaremos as informações escritas no seu prontuário e faremos um exame físico composto apenas pela palpação da região operada. Precisamos ainda que a senhora concorde em doar uma pequena amostra de sangue (15ml que equivale a menos que uma seringa) para que possamos estudar o seu sangue (avaliação do seu DNA) e descobrir porque alguns pacientes apresentam mais efeitos colaterais que outros.

- Seu acompanhamento e tratamento não serão alterados em nada por este estudo.

- Os resultados deste estudo poderão ajudar a desenvolver um método para diminuir os efeitos colaterais do tratamento com a radioterapia;

- Seus dados pessoais (como nome) permanecerão confidenciais, sem exposição pública, sendo a senhora identificada apenas por um número;

- Não haverá qualquer compensação financeira por sua participação ou danos pela pesquisa, mas se houver necessidade, você terá a assistência necessária;

- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer hora sem prejuízo para seu tratamento ou acompanhamento;

Eu, _____,

RG _____, CPF _____, prontuário _____, concordo em participar da pesquisa acima descrita, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Goiânia, ____ de _____ de 200__ .

Assinatura da paciente

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: _____ Assinatura: _____

Testemunha: _____ Assinatura: _____

ANEXO 03

Morbidade Aguda segundo o RTOG

Tabela 1 – Pele

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Eritema folicular fraco ou apagado, depilação, descamação seca, diminuição da sudorese.
Grau 2	Eritema brando ou claro, descamação úmida em placas, edema moderado.
Grau 3	Descamação úmida confluyente, além das dobras da pele ou edema em casca de laranja.
Grau 4	Ulceração, hemorragia ou necrose.

Morbidade Tardia segundo o RTOG

Tabela 2 – Pele

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Ligeira atrofia; alteração da pigmentação; alguma perda de cabelo
Grau 2	Atrofia moderada; moderada telangiectasia, perda de cabelo total.
Grau 3	Atrofia grave; telelanguectasia intensa
Grau 4	Ulceração.

* Grau 5: Morte.

Morbidade Tardia segundo o RTOG

Tabela 3- Subcutâneo

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Ligeira fibrose; e perda da gordura do subcutâneo
Grau 2	Fibrose moderada porém assintomática; ligeira retração do campo; <10% de redução linear
Grau 3	Endurecimento grave e perda de tecido subcutâneo; medida linear de retração de campo > 10%
Grau 4	Necrose .

* Grau 5: Morte.

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1341-6.

Anexo 4

Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROCOLO CEPACCG Nº 035/07

Goiânia, 27/09/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares

TÍTULO: Implantação do 1º Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia de Goiás

SUB PROJETO 1- Predição da radiosensibilidade da pele e do tecido subcutâneo pela análise do polimorfismo dos genes p53 e ATM: Avaliação prospectiva e retrospectiva de pacientes com câncer de mama submetidas à radioterapia

SUB PROJETO 2- Radiossensibilidade exacerbada do tecido normal em tratamento radioterápico para tumores de cabeça e pescoço, câncer de próstata: Análise dos polimorfismos de base única (SNPs) do gene p53 e do ATM

SUB PROJETO 3- Reparo e repopulação tumoral: Avaliação do papel do p53 na radioresistência tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço


Área Temática: Grupo III

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, analisou e **aprovou sem restrições** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os sub projetos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios trimestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEPACCG