

CATARINA MARIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA SEDIYAMA

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA E
DOSAGEM DE FRAÇÃO LIVRE DE DNA EM MULHERES ATENDIDAS NA
MATERNIDADE ODETE VALADARES, BELO HORIZONTE - MG**

Dissertação apresenta à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S448a
2011

Sediyama, Catarina Maria Nogueira de Oliveira, 1977-
Avaliação dos fatores de risco para o câncer de mama e
dosagem de fração livre de DNA em mulheres atendidas na
maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte - MG /
Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sediyama. – Viçosa,
MG, 2011.

x, 81f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mamas - Câncer - Fatores de risco. 2. Mamas - Câncer -
Prevenção. 3. Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.
4. β -actina. 5. Ácido desoxirribonucleico - Análise.
6. Reação em cadeia de polimerase. 7. Genética molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 616.994

CATARINA MARIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA SEDIYAMA

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA E
DOSAGEM DE FRAÇÃO LIVRE DE DNA EM MULHERES ATENDIDAS NA
MATERNIDADE ODETE VALADARES, BELO HORIZONTE - MG**

Dissertação apresenta à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 29 de julho de 2011.

Prof^a. Rita de Cássia Lanes Ribeiro

Prof^a. Alessandra Barbosa Ferreira

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

*Dedico este trabalho ao meu filho Antônio,
ao meu marido André, aos meus pais Aderbal e Adélia,
e à minha família por acreditarem sempre em minha capacidade.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e aprendizados.

À minha mãe Adélia e a Antônio, por serem a razão do meu viver e inspiração para tudo o que faço.

Ao meu marido André e ao meu pai, Aderbal, pelo suporte, pelo apoio e pela confiança ao longo da vida, por serem minha base, meu alicerce, o que me permitiu chegar até aqui.

Ao querido irmão Lourenço e a Niziane, pelo apoio incondicional e por realmente acreditarem em mim todo esse tempo.

À Camila, por me fazer acreditar que eu era capaz de fazer o mestrado, pela tranquilidade em lidar com as dificuldades nos momentos mais difíceis, pelas palavras de incentivo e sabedoria. Sem seu apoio nada disso seria possível.

Aos meus familiares, pelas palavras de incentivo.

À Tia Eliane Nogueira e ao Professor Carlos Sedyama que me serviram de modelo acadêmico e humano a ser seguido. A convivência com vocês me permitiu ampliar meus horizontes.

À Professora Sylvia Franceschini, pela amizade, pelo apoio e por sempre me motivar e ajudar ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Labin e do Laboratório de Imunovirologia, pela ajuda, pelo incentivo e pela receptividade e por me mostrarem que o caminho era árduo, mas possível.

Aos colegas da Divisão de Saúde da UFV pelo incentivo durante esta jornada.

Ao Klaus, pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

Aos Professores Sérgio de Paula e Andréia, pela colaboração no trabalho e nas análises estatísticas.

Ao Professor Marcelo Loureiro pela contribuição na realização dos trabalhos

À Maria e Elisabete, pelo suporte domiciliar, fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Monise, cujo apoio contribuiu para a realização deste trabalho e cujo incentivo foi fundamental nessa jornada.

Ao Alípio, pelo apoio técnico, pela seriedade e paciência.

Aos membros da banca, Profa. Maria do Carmo, Profa. Rita Lanes e Dra. Alessandra, pelas contribuições necessárias a finalização da dissertação.

E agradeço em especial à pessoa que permitiu que esse sonho se realizasse, cuja coragem, altruísmo, honestidade e otimismo são admiráveis, um verdadeiro modelo de professora, mãe e mulher, minha querida orientadora Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

BIOGRAFIA

Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sedyama, filha de Aderbal Pereira de Oliveira e Adélia das Graças Nogueira Oliveira, esposa de André Kiyomitsu Zanuncio Sedyama, nasceu no dia 29 de março de 1977, em Vitória da Conquista, Bahia.

Cursou o ensino médio no Colégio Pitágoras, em Belo Horizonte, MG, entre 1992 e 1994. Em março de 1996, ingressou no curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, obtendo seu título de graduação em janeiro de 2002. Em fevereiro de 2003, ingressou na Residência em Clínica Médica no Hospital Municipal Odilon Behrens, em Belo Horizonte, e em fevereiro de 2005, ingressou na Residência de Cancerologia Clínica na Santa Casa de Limeira, Limeira, São Paulo. Em agosto de 2009, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação no dia 29 de julho de 2011, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1-INTRODUÇÃO.....	1
2 – CAPÍTULO 1- CÂNCER DE MAMA.....	2
RESUMO.....	2
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	3
2.2 CONCEITO.....	5
2.3 TIPOS HISTOLÓGICOS.....	5
2.4 ESTADIAMENTO.....	7
2.5 FATORES DE RISCO.....	9
2.5.1 SEXO E IDADE.....	9
2.5.2 ETNIA E RAÇA.....	10
2.5.3 HISTÓRIA PRÉVIA DE DOENÇA BENIGNA.....	11
2.5.4 HISTÓRIA PRÉVIA DE CÂNCER DE MAMA.....	11
2.5.5 ESTILO DE VIDA.....	11
2.5.6 FATORES REPRODUTIVOS E HORMONAIS.....	13
2.5.7 FATORES SOCIOECONÔMICOS.....	14
2.5.8 RADIAÇÃO IONIZANTE.....	15
2.5.9 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER DE MAMA E GENÉTICA.....	15
2.5.10 FATORES PROTETORES.....	16
2.6 FATORES PROGNÓSTICOS.....	16
2.7 FRAÇÕES LIVRES DE DNA.....	17
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
3- CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA EM PACIENTES DE UM ESTUDO CASO-CONTROLE DESENVOLVIDO NA MATERNIDADE ODETE VALADARES, BELO HORIZONTE- MG	
RESUMO.....	32
3.1 INTRODUÇÃO.....	33
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	
3.2.1 CASUÍSTICA.....	34
3.2.2 ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	36
3.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	39
3.3 RESULTADOS.....	39
3.4 DISCUSSÃO.....	43
3.5 CONCLUSÃO.....	49
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
4- CAPÍTULO 3-DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO LIVRE DE DNA PLASMÁTICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA: COMPARAÇÃO ENTRE OS GENES GAPDH E B-ACTINA.	
RESUMO.....	55
4.1 INTRODUÇÃO.....	56
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	
4.2.1 CASUÍSTICA.....	58
4.2.2 ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	59
4.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
4.3 RESULTADOS	
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO.....	61

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	64
4.4 DISCUSSÃO.....	66
4.5 CONCLUSÃO.....	70
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
5-CONCLUSÕES.....	74
6-ANEXOS	
5.1 ANEXO I.....	75
5.2ANEXO II.....	78
5.3 ANEXO III.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACO.....	Anticoncepcional oral
AJCC.....	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<i>brcA1</i>	<i>Breast Cancer 1 gene</i>
<i>brcA2</i>	<i>Breast Cancer 2 gene</i>
BIRADS.....	<i>Breast Imaging-Reporting and Data System</i>
Ca.....	Câncer
CLIS.....	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CDIS.....	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DNA.....	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
EUA.....	Estados Unidos da América
FHEMIG.....	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
GAPDH.....	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCA.....	Grupo câncer de mama
GCO.....	Grupo controle
HFDB.....	História familiar de doença benigna
HFCA.....	Historia familiar de câncer de mama
HPDB.....	História progressa de doença benigna
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
IMC.....	Índice de Massa Corporal
MOV.....	Maternidade Odete Valadares
NCCN.....	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NCI.....	<i>National Cancer Institute</i>
PAR.....	Países de alta renda
PBR.....	Países de baixa renda
PMR.....	Países de média renda
RCQ.....	Relação cintura-quadril
TRH.....	Terapia de reposição hormonal
WHO.....	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

SEDIYAMA, Catarina Maria Nogueira de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Avaliação dos fatores de risco para o câncer de mama e dosagem de frações livres de DNA em mulheres atendidas na Maternidade Odete Valadares, em Belo Horizonte, Minas Gerais.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Orientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Andréia Queiroz Ribeiro.

O câncer de mama hoje é uma das patologias mais prevalentes entre as mulheres, principalmente entre 40 e 60 anos, com mortalidade inversamente proporcional à precocidade diagnóstica. Dentre os fatores de risco mais conhecidos estão aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher, como nuliparidade, terapia de reposição hormonal, idade precoce da menarca e menopausa tardia, além de outros como história familiar de câncer de mama e obesidade. Métodos de diagnóstico precoce são almejados, e a descoberta de frações livres de DNA no sangue de pacientes de diversas patologias, dentre elas o câncer, levou à busca da possível utilização da dosagem dos níveis de frações livres de DNA (FLDNA) como método diagnóstico. O objetivo geral deste trabalho foi estudar a associação entre os níveis de fração livre de DNA plasmático e a presença de câncer de mama e a associação entre a exposição aos fatores de risco para o câncer (Ca) mama e o diagnóstico em mulheres atendidas no serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram selecionadas 456 mulheres, 261 portadoras de câncer de mama (GCA), 195 controles com ausência de neoplasia ou doença benigna da mama (GCO). Foi avaliada a exposição a fatores de risco para o Ca mama na população, por meio de questionários e medidas antropométricas. Foram selecionadas 30 mulheres do GCA e 20 mulheres do GCO para a dosagem de FLDNA plasmático por PCR em tempo real, utilizando os genes que codificam o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -actina. Foram verificados maiores níveis de FLDNA em pacientes com Ca mama utilizando a β -actina em relação aos controles, e o GAPDH mostrou-se incapaz de identificar positivamente as pacientes portadoras de neoplasia. Os resultados encontrados sugerem que a presença de frações livres de DNA plasmático têm correlação com o diagnóstico de câncer de mama em mulheres, mas a metodologia ainda necessita de aprimoramento. As variáveis inatividade física, menopausa, nuliparidade, ausência de amamentação e história familiar de Ca de mama tiveram associação positiva com o Ca mama. Na população estudada, o álcool conferiu proteção contra o Ca de mama. Sugere-se o desenvolvimento de estudos voltados para a padronização da metodologia de

extração e dosagem de FLDNA, a fim de aperfeiçoar a utilização desse método para diagnóstico ou prognóstico.

ABSTRACT

SEDIYAMA, Catarina Maria Nogueira de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Evaluation breast cancer's risk factors and determination of cell free DNA in women evaluated in Odete Valadares Maternity, in Belo Horizonte, Minas Gerais.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Andréia Queiroz Ribeiro.

Breast cancer (BC) today is one of the most prevalent diseases among women, mainly between 40 and 60 years, with a mortality rate inversely proportional to early diagnosis. Among the known risk factors are those related to the woman's reproductive life, such as nulliparity, use of hormone replacement therapy, early age at menarche and late menopause, and other family history of breast cancer and obesity. Methods of early diagnosis is desired, and the discovery of free fraction of DNA in the blood of patients with various pathologies such as cancer, led the search for possible use dosage levels of cell free DNA fractions (CFDNA) as a diagnostic method. The aim of this study was to study the association between levels of free fraction of plasma DNA and the presence of breast cancer and the association between exposure to risk factors for BC and BC diagnosis in women attending the Odete Valadares Maternity's mastology service, in Belo Horizonte, Minas Gerais. We selected 456 women, 261 breast cancer patients (BCG) 195 controls with absence malignancy or benign breast disease (CG). We evaluated the exposure to risk factors for BC in the population, through questionnaires and interviews obtained by anthropometric measurements. We selected 30 women of the BCG, 20 women in the CG for dosing CFDNA plasma by real-time PCR using the genes encoding the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin. It was found higher levels of CFDNA in patients with BC using the β -actin, compared with controls, whereas GAPDH was unable to positively identify the patients with cancer. The results suggest that the presence of free fraction of plasma DNA correlates with the diagnosis of breast cancer in women, but the methodology still needs improvement. The variables physical inactivity, menopause, nulliparity, lack of breastfeeding and family history of breast cancer had positive association with breast cancer, and at this studied population alcohol had a protective effect against BC. We suggest the development of studies on the standardization of the method for extraction and measurement of CFDNA order to improve the use of this method for the diagnosis or prognosis.

1.INTRODUÇÃO

O câncer (Ca) de mama é um problema de saúde pública por sua elevada morbimortalidade populacional. É o tumor mais incidente em mulheres, acometendo-as principalmente após os 40 anos, mas atualmente tem acometido mulheres cada vez mais jovens, um fenômeno raro e ainda não explicado.

O desenvolvimento dos tumores malignos está relacionado aos hábitos de vida do indivíduo, à exposição a fatores considerados de risco, à genética, no caso do Ca de mama, a mutação dos genes *brcA1* e 2, e à exposição a condições, muitas vezes fisiológicas, que aumentam a exposição hormonal como a menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia do primeiro filho e nuliparidade, dentre outros.

O diagnóstico dessa patologia é realizado de maneira invasiva, por cirurgia ou biópsia, trazendo desconforto e mutilações para os pacientes. A possibilidade fazê-lo de modo fácil, rápido e pouco invasivo é o objetivo do estudo de especialistas, a fim de simplificá-lo, minimizar os danos aos pacientes, e aumentar o número de pessoas beneficiadas pelo rastreamento dessa patologia. Desde a descoberta de fragmentos de DNA (FLDNA) em sangue periférico humano, tem-se estudado a possibilidade de utilizar essa técnica para rastreamento de patologias diversas.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a associação entre os níveis de FLDNA e a presença de câncer de mama e a associação entre a exposição aos fatores de risco para o câncer de mama e o diagnóstico em mulheres atendidas no serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Como objetivos específicos, este estudo buscou avaliar o nível das FLDNA em mulheres sadias e em portadoras de neoplasia de mama utilizando dois marcadores, GAPDH e β -actina; estabelecer entre o GAPDH e a β -actina o melhor marcador para a dosagem e correlação das FLDNA e Ca de mama; e investigar a associação entre a exposição pregressa aos principais fatores de risco, como nuliparidade, idade da menopausa e menarca, amamentação, terapia hormonal pré e pós-menopausa, atividade física, hábitos como tabagismo e etilismo, e características antropométricas como peso, IMC e RCQ e o desenvolvimento da patologia.

2. Capítulo 1- Câncer de Mama

Resumo

O câncer é uma das enfermidades mais frequentes no mundo, e entre as mulheres o Ca de mama é o mais incidente (excluindo pele não melanoma). No Brasil, em 2010, a projeção foi de cerca de 49.000 casos, com aproximadamente 49 mulheres acometidas a cada 100.000, com taxa de mortalidade estável desde a década de 90. Os principais fatores de risco são os relacionados à vida reprodutiva da mulher, como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, ausência de amamentação, terapia de reposição hormonal, estilo de vida, como consumo de álcool, inatividade física, excesso de peso e o envelhecimento. Existem também, em menor proporção, fatores genéticos, como a mutação no gene *brcA* 1 e 2, que cursam com risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasia de mama, como para outros tumores. O principal método diagnóstico populacional é a mamografia e o exame clínico das mamas. A mamografia é utilizada como método de rastreamento populacional desde os anos 80, com aumento do número de casos diagnosticados, principalmente em estágios precoces, com grande impacto na redução da mortalidade. Ainda buscam-se novas alternativas diagnósticas e prognósticas a fim de nortear o médico sobre a melhor estratégia de tratamento e acompanhamento dessas pacientes. Desde os anos 70 é descrita a associação de fragmentos de DNA em sangue periférico e a neoplasia em humanos. Apesar do esforço da comunidade científica em demonstrar e consolidar esses resultados, diferenças metodológicas entre os estudos ainda se sobrepõem aos resultados. Esta revisão bibliográfica foi realizada por meio de consulta dos principais bancos de dados e sites como Scielo, Pubmed, DATASUS, WHO, Ministério da Saúde-INCA, *Nacional Cancer Institute*, *National Comprehensive Cancer Network*, e teve como objetivo analisar criticamente a relação entre os fatores de risco e o desenvolvimento do Ca de mama, demonstrando as bases teóricas da utilização da dosagem de FLDNA em patologias diversas e no Ca de mama.

2.1 Introdução: Epidemiologia do Câncer de Mama

As mudanças nos hábitos de vida da população, a melhoria nas condições de saneamento básico, a descoberta do antibiótico e o aumento da expectativa de vida da população ocorrido ao longo do século XX culminaram na redução da taxa de mortalidade por doenças infecciosas e na elevação da incidência e prevalência das chamadas doenças crônicas não infecciosas, como hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* e câncer. A distribuição mundial dos tipos de câncer não é homogênea. Na África e no Sudeste Asiático, o mais comum é o de colo do útero, enquanto que globalmente, o de maior incidência é o de pulmão, seguido pelo de mama (MATHERS *et al.*, 2008).

Na população masculina, o câncer de pulmão ainda é o responsável pelo maior número de mortes e, na população feminina, é o de mama, seguido pelo de pulmão e estômago. Nos países de alta renda (PAR), como na América do Norte, Europa e países mediterrâneos, o câncer de mama configura entre os mais frequentes, contrastando com países do Pacífico Ocidental, com as menores taxas de incidência. Em 2004, nos países com renda maior que \$10.066,00 *per capita* (PAR), o câncer de mama é a nona causa de mortalidade populacional, responsável por cerca de 200.000 mortes (2 % do total), o que não foi observado em países de baixa e média renda (PBR e PMR). O número estimado de mortes de mulheres, no mundo, por essa causa foi de 517.000 mulheres, o que representa 1,9 % dos casos (MATHERS *et al.*, 2008).

Segundo o *Global Burden of Disease Study* (2004), publicado em 2008, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte na população, sendo responsável por até 31,5 % entre as mulheres; seguida por doenças infecciosas e parasitárias (15,6 %), pelo câncer (11,8 %). A incidência global é de 11,4 milhões de pessoas acometidas; a maioria diagnosticadas nos PAR em comparação com os PMR ou PBR (MATHERS *et al.*, 2008).

Em 2008, a população mundial era de 6.750.061.000 habitantes e foram diagnosticados 12,66 milhões de novos casos de câncer. Entre as mulheres, o número de óbitos mundial por câncer foi de 3.345.200, desses, 458.503 (12,5/100.000) por Ca de mama, cuja incidência, em 2008, foi de 1.384.155 (39/100.000). O risco de desenvolver câncer de mama antes dos 75 anos entre mulheres foi estimado em 16,5 %, e o de morrer antes dessa idade por essa causa foi de 9,1 % (WHO, 2008).

Nos Estados Unidos (EUA), em 2010, 207.090 mulheres foram diagnosticadas com Ca de mama e 39.840 morreram por essa causa (NCI e NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011a). Já no Brasil, no mesmo período, a incidência estimada foi de

49.240. Existe uma discrepância entre os países desenvolvidos e os outros, em relação à proporção de diagnóstico e mortalidade por Ca de mama, com maior número de casos diagnosticados por ano e menor taxa de mortalidade nos países mais ricos, devido ao diagnóstico e início de terapêutica precoces, com reflexo na menor mortalidade por causa específica (WHO, 2008). A taxa de mortalidade por Ca de mama nos EUA é decrescente desde os anos 90, mas essa ainda é a principal causa de morte entre mulheres com idade entre 40 e 79 anos (CDC *et al.*, 2010).

Segundo a projeção de mortes por câncer, o número de óbitos de 7,4 milhões em 2004 subiria para estimados 11,8 milhões em 2030, principalmente em decorrência do envelhecimento populacional em todos os países, e nos PAR por influência também de mudanças epidemiológicas da população (MATHERS *et al.*, 2008).

No Brasil, o total de óbitos em mulheres por Ca de mama apresentou elevação no final da década de 70 e no início dos anos 80. Desde o final da década de 90 apresenta-se estável. No período entre 1979 e 1983 era de 13,73/100.000; e elevou-se para 15,55 no período entre 1995 e 1999 (INCA, 2002), mantendo-se então no patamar estável de 15,6/100.000 entre 1999 e 2008 (INCA, 2002; INCA, 2010). As taxas de mortalidade brutas e ajustadas (por idade nas populações mundial e brasileira) por 100.000 mulheres, entre 1979 e 1999, no Brasil, apresentaram índices inferiores aos mundiais no mesmo período (INCA, 2002).

Em relação ao Ca de mama no território nacional, no período de 2000 e 2004, as cidades com maiores incidências foram Porto Alegre, Belo Horizonte e São Paulo (INCA, 2010). A estimativa feita pelo INCA para o biênio 2010-11 (INCA, 2002; INCA, 2009) mostrou ainda Porto Alegre como a capital com a maior incidência, seguida pelo Rio de Janeiro e São Paulo. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. Uma das explicações para esse predomínio de cidades da região Sul e Sudeste nos primeiros lugares pode ser a maior densidade populacional dessas regiões, além da distribuição dos mamógrafos no Brasil, cuja concentração é maior na região Sul e Sudeste, em relação ao Norte e Nordeste, possibilitando maior facilidade diagnóstica. Essas regiões são mais desenvolvidas economicamente, com possível reflexo na mudança do padrão reprodutivo das mulheres, queda da fecundidade em maior proporção do que nas outras regiões.

Estimativas brasileiras para 2010/2011 mostraram que o câncer foi uma das principais causas de morte, com 489.270 novos casos esperados para toda a população. Entre as mulheres, o número estimado é de 253.030 novos casos, com 49.240 de mama,

e risco estimado de 49 casos para cada 100.000 mulheres, sendo o terceiro mais incidente na população brasileira, precedido pelo de pele não melanoma (114 mil casos novos) e de próstata (52.000) (INCA, Agosto 2010).

2.2 Conceito

O câncer de mama é caracterizado pelo surgimento, no tecido mamário, de células que não respeitam a organização tecidual, adquirem, por meio de mutações, capacidade de invasão e colonização de tecidos diferentes dos de origem (capacidade de metastatizar), além de proliferação, sem respeitar os mecanismos de restrição do crescimento celular. Essas células dão origem a clones, que mantêm suas características, gerando uma população celular que passa a não respeitar a organização tecidual padrão. A presença de uma única mutação não é o suficiente para o desenvolvimento de uma neoplasia, mas o acúmulo de mutações aleatórias ao longo da vida em determinada linhagem celular pode levar ao surgimento dessa patologia, o que explica o aumento da incidência do câncer com o envelhecimento. Para aqueles cânceres relacionados à exposição à causa ou agente externo, é necessário longo período até o completo desenvolvimento da patologia, a partir de pequenas alterações celulares (ALBERTS *et al.*, 2007b).

No câncer, ocorrem sucessivos ciclos de divisão celular, mutações e seleção natural das células, que adquiriram maior capacidade de se desenvolver e replicar em condições adversas, de maneira que o tumor se torne cada vez mais adaptado e capaz de manter crescimento incontrolável, à medida que adquire mutações vantajosas à proliferação celular, invasividade e inibição da apoptose (ALBERTS *et al.*, 2007a; ALBERTS *et al.*, 2007b).

2.3 Tipos Histológicos

Os cânceres que são derivados de células epiteliais são conhecidos como carcinomas, e correspondem a aproximadamente 90 % dos casos de neoplasia maligna (ALBERTS *et al.*, 2007b).

O câncer de mama tem diferentes tipos histológicos, de acordo com a origem da célula tumoral. As alterações proliferativas da mama ocorrem no epitélio lobular e tubular, que vão de hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* até carcinoma invasivo (FILHO, 2006).

A partir do ducto normal, a evolução das lesões proliferativas ductais ocorre com a formação de hiperplasia ductal usual, inicialmente sem e posteriormente com

atipias celulares, hiperplasia ductal atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma microinvasor. Assim como as hiperplasias ductais, as lobulares também têm processo evolutivo semelhante, mas tendem a ser multifocais e bilaterais (FILHO, 2006).

As neoplasias *in situ* são de melhores prognósticos e são consideradas como doença localizada, pois as células tumorais estão restritas aos ductos e dútulos mamários, sem invasão de membrana basal e são de dois tipos: carcinoma ductal (CDIS) ou lobular (CLIS) *in situ*. Apesar de hoje serem considerados de origem comum, nas unidades terminais ducto-lobular, a diferenciação entre os dois tipos é realizada de acordo com características da diferenciação celular (FILHO, 2006).

Desde o início da década de 80, entre as americanas, a incidência de neoplasia *in situ* tanto em mulheres acima de 50 anos quanto naquelas com idade entre 20 e 49 anos é crescente, possivelmente devido aos programas de rastreamento populacional com mamografia e exame clínico das mamas realizados na população americana nas últimas décadas (HOWLADER *et al.*, 2009).

No carcinoma invasivo, diferentemente do *in situ*, ocorre a invasão estromal pelas células tumorais. O carcinoma invasivo de origem ductal responde pela grande maioria dos casos, até 80 % (BARTELLA *et al.*, 2007). Em segundo lugar, com incidência entre 5 e 10 %, está o carcinoma lobular e, desses, até 2/3 dos casos são carcinoma lobular clássico (SASTRE-GARAU *et al.*, 1996). Este tipo é conhecido por sua multifocalidade e bilateralidade. Outros tipos menos comuns como o medular, tubular, mucinoso, papilar e inflamatório são subtipos do carcinoma ductal invasivo (DEVITTA JR *et al.*, 2005; FILHO, 2006; BARTELLA *et al.*, 2007).

Há ainda a Doença de Paget, que ocorre quando o tumor acomete as células da epiderme do complexo areolar, podendo ser acompanhado de carcinoma ductal ou intraductal, e responde por 1 % dos casos (SAKORAFAS *et al.*, 2001; BARTELLA *et al.*, 2007; EDGE *et al.*, 2010). Os tumores invasivos de mama de melhor prognóstico são os que possuem componente mucinoso, tubular e *phyllodes* (DIAB *et al.*, 1999).

Atualmente, ainda se classificam os tumores de mama de acordo com características moleculares que caracterizam os perfis de expressão gênica, obtidos de exames como o *Oncotype DX* e *Mammaprint*. São classificados em quatro subtipos: Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo, e Basalóide, de acordo com a expressão de receptores hormonais e positividade para HER2 (SØRLIE *et al.*, 2001).

2.4 Estadiamento

O estadiamento do tumor de mama varia de acordo com o tamanho do tumor (T), a presença ou ausência de invasão linfonodal e número de linfonodos acometidos (N), e presença de metástase à distância (M), caracterizada por invasão tumoral de outros órgãos.

O estadiamento correto permite melhor estimativa de risco de recorrência e mortalidade, permitindo assim traçar a melhor estratégia de tratamento para a paciente, de acordo com as características da sua patologia. De acordo com o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), essas são as características que permitem o agrupamento prognóstico (EDGE *et al.*, 2010).

A seguir, nas Tabelas 1 e 2, são demonstrados os estadiamentos do câncer de mama, de acordo com o *American Joint Committee on Cancer 2010* (AJCC).

Tabela 1- Estadiamento simplificado TNM* para o câncer de mama segundo AJCC[#] 2010

I	IA	T1 N0 M0
	IB	T0-1 N1mi M0
II	IIA	T0-1 N1 M0 T2 N0 M0
	IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0
		IIIC
III	IIIA	T0-2 N2 M0 T3 N1-2 M0
	IIIB	T4 N0-2 M0
	IIIC	Qualquer T N3 M0
IV		Qualquer T qualquer N M1

* (T-tumor, N-linfonodos, M-metástase)

[#] *American Joint Committee on Cancer*

Tabela 2- Estadiamento de acordo com a classificação de tumores malignos TNM* para câncer de mama, de acordo com o AJCC# 2010

Tx	Tumor primário não acessível		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Lesão <i>in situ</i>	CLIS	CDIS Paget
T1	Lesão ≤ 2 cm	T1mi – microinvasão ≤ 0,1 cm T1a > 0,1 cm e ≤ 0,5 cm T1b > 0,5 cm e ≤ 1 cm T1c > 1 cm e ≤ 2 cm	
T2	Lesão > 2 cm e ≤ 5 cm		
T3	Lesão > 5 cm		
T4	Lesão de qualquer tamanho com extensão direta para estruturas vizinhas	T4a - parede torácica T4b -pele T4c - pele e parede torácica T4d - câncer inflamatório	
N0	Sem metástase regional		
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis		
N2	Acometimento de linfonodos axilares fixos e/ou cadeia mamária	N2a - metástase para linfonodos axilares ipsilaterais fixos N2b : metástase clinicamente aparente apenas em linfonodos da cadeia mamária interna ipsilateral (ausência de metástase clínica na cadeia axilar)	
N3	Acometimento de cadeia supra ou infraclavicular, ou mamária e axilar concomitante	N3a - metástase para linfonodos da cadeia infraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar N3b - metástase clinicamente aparente na cadeia mamária interna ipsilateral, na presença de metástase clinicamente positiva na região axilar N3c - metástase na cadeia supraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar ou mamária interna	
M1	Presença de metástase à distância		

* (T-tumor, N-linfonodos, M-metástase)

American Joint Committee on Cancer

2.5 Fatores de Risco

São fatores de risco para o Ca de mama as condições relacionadas ao estilo de vida, à vida reprodutiva e a características genéticas, dentre os mais conhecidos a idade e o sexo, a raça e etnia, a doença benigna da mama, a história pessoal de Ca de mama, o estilo de vida e dieta, os fatores de risco reprodutivos e hormonais, os fatores socioeconômicos, a exposição à radiação ionizante e história familiar e fatores genéticos.

Em até 90 % dos casos, o Ca de mama pode ocorrer por aparecimento esporádico, sem correlação com fatores genéticos ou síndromes clínicas. Em cerca de 10 % dos casos, o aparecimento dessa patologia é correlacionado às mutações genéticas, dentre elas as dos genes *brcA* 1 e 2 respondem por até 20 % dos casos, e mutações em genes como *p53*, *pten*, e outros ainda não descritos pelos outros 80% dos casos (PONDER, 2001; VENKITARAMAN, 2002; AMENDOLA e VIEIRA, 2005).

Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento do câncer de mama esporádico (90% dos casos) está fortemente relacionado à produção de esteróides sexuais. Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como a menarca precoce (<12 anos), menopausa tardia (>50 anos) e gestação (nuliparidade), assim como a utilização de estrógenos exógenos são componentes relevantes para o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer (TIEZZI, 2009).

Os fatores de risco mais estudados relacionados à vida reprodutiva da mulher são a nuliparidade, menarca precoce (<12 anos), idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal e menopausa tardia (>55 anos).

Uma das características que poderia contribuir para uma incidência de Ca de mama maior em países desenvolvidos seria a diferença entre o padrão reprodutivo das mulheres e o número de filhos; nos países em desenvolvimento o número de filhos é maior e a idade da mulher na primeira gestação é menor, quando comparados aos de países desenvolvidos. A nuliparidade, menarca precoce, primeiro parto tardio são características do aumento de risco dessa patologia, por maior tempo de exposição ao estrogênio ao longo da vida (PIKE *et al.*, 1983).

2.5.1 Sexo e Idade

A idade continua sendo um dos fatores de risco mais importantes para o aparecimento dessa neoplasia (LACEY JR *et al.*, 2009). As taxas de incidência

aumentam rapidamente entre os 40-50 anos, e posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é atribuída às mudanças hormonais ocorridas na menopausa (INCA, 2010), devido à queda dos níveis hormonais. Nos EUA, a incidência de Ca de mama é maior em mulheres com mais de 50 anos quando comparado com aquelas com idade inferior (CDC e PREVENTION, 2000). Em meados da década de 70, a taxa de incidência era quase três vezes maior entre mulheres com idade acima de 50 anos, em relação às mulheres com idade menor. Essa taxa chegou a cerca de 400 mulheres para cada 100.000 (4 vezes) na década de 90, caindo para 350 mulheres a cada 100.000, após 2006 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009a; HOWLADER *et al.*, 2009).

Em relação ao sexo, a diferença na incidência do Ca de mama é marcadamente superior nas mulheres em relação aos homens (CDC *et al.*, 2010). Em 2010, nos EUA, a incidência nas mulheres foi de 207.090 casos novos contra 1.970 em homens (NCI e NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011b).

2.5.2 Etnia e raça

Em relação à etnia, dados da Sociedade Americana de Câncer mostram maior incidência entre as mulheres brancas, a partir dos 45 anos (124 casos por 100.000 mulheres). Entre as mulheres afro-americanas, a incidência é menor (113 por 100.000 mulheres). Em outros grupos étnicos, ela é menor em todo o país (americanos asiáticos/ilhas do Pacífico com 82 por 100.000, hispânico-latinos com 90 por 100.000, e índios americano-nativos do Alasca com 92 por 100.000). Em relação a essa diferença, a taxa de mortalidade entre as mulheres americanas brancas é menor. As afro-americanas possuem maior probabilidade de morrer por essa causa em todas as faixas etárias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009a).

Quando se avalia a sobrevida em cinco anos, por neoplasia de mama entre as mulheres brancas e afro-americanas (EUA), há uma nítida diferença desde a década de 70 entre os dois grupos, com sobrevida maior entre as mulheres brancas (entre 1975-1977, 76 % e 62 %, 1984-1986, 80 % e 65 %, e entre 1999-2005, 91 % e 79 %, respectivamente entre as mulheres brancas e as afro-americanas) (JEMAL *et al.*, 2010).

Essas discrepâncias são também explicadas em parte pelas condições socioeconômicas distintas entre os grupos étnicos, com maior acesso aos métodos diagnósticos e tratamento, e as diferenças no estilo de vida. Nos EUA, a patologia é diagnosticada em estágios mais precoces em mulheres brancas, 61 % delas são com doença localizada, 32 % com doença regionalmente avançada, e cerca de 4 % com

doença à distância. Entre as negras, essas taxas são respectivamente 51 %, 39 % e 8 %, com reflexo nas taxas de mortalidade entre esses grupos (JEMAL *et al.*, 2010).

2.5.3 História Prévia de Doença Benigna

A presença de doença benigna não proliferativa da mama não está associada ao risco aumentado de desenvolver neoplasia. As lesões benignas proliferativas são fatores de risco para o Ca de mama, enquanto aquelas sem atipias conferem uma pequena elevação de 1,5 a 2 vezes no risco. As lesões proliferativas com atipias celulares (além de possuírem crescimento excessivo de células dos ductos ou lobos, as células ainda diferem da normalidade) conferem um risco aumentado em até cinco vezes de desenvolver câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009a).

As mulheres com história de doença benigna têm uma probabilidade de desenvolver Ca de mama até os 70 anos de 57 % quando comparadas às mulheres sem doença benigna da mama (COLDITZ e ROSNER, 2000).

2.5.4 História Progressiva de Ca de mama

As mulheres que já tiveram um diagnóstico de Ca de mama têm um risco aumentado de desenvolverem novo tumor de mama, com uma forte relação com a idade jovem no diagnóstico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009a).

2.5.5 Estilo de vida

Estudos indicam que o estilo de vida adotado pela população, principalmente no que se refere a modificações na dieta e na atividade física, podem contribuir para modificar a incidência do câncer de mama em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2004).

Em relação ao etilismo, o consumo diário bebida alcoólica, principalmente por mulheres pré-menopausadas, aumenta o risco de câncer de mama aos 70 anos em até 7 % (COLDITZ e ROSNER, 2000; KEY *et al.*, 2003).

O *Nurses' Health Study* (2006) sugeriu que o ganho de peso na vida adulta, mesmo após os 18 anos ou após a menopausa, elevaria o risco de Ca de mama entre mulheres pós-menopausadas, especialmente naquelas que não usaram reposição hormonal pós-menopausa, e que a perda de peso estaria relacionada à redução de risco, em todas as mulheres, independente da presença ou não de reposição hormonal pós-menopausa, e mesmo que a perda de peso fosse antes da menopausa (ELIASSEN *et al.*, 2006). Sabendo-se que nas mulheres pós-menopausadas o peso exerce forte influência nos níveis de hormônios sexuais, possivelmente a perda de peso levaria à redução dos

níveis hormonais circulantes, pois haveria menor conversão periférica de hormônios, principal responsável pela manutenção hormonal em mulheres pós-menopausadas. Já nas mulheres pré-menopausadas, o excesso de peso está relacionado aos períodos anovulatórios, o que conferiria redução de risco nessa população. Em estudos comparando as mulheres na pré e pós-menopausa, enquanto o IMC se correlacionava diretamente com o risco de Ca de mama em mulheres menopausadas, nas pré-menopausadas, o IMC era inversamente relacionado ao risco, especialmente naquelas com IMC maior que 31 (VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000; KLUTTIG e POKRZYWNIAK, 2009).

Em relação ao excesso de peso de mulheres pré-menopausadas, foi encontrada associação inversa: aquelas que possuíam IMC maior que 31 tinham 46 % menos chance de ter neoplasia de mama em relação às aquelas com IMC menor que 21 (VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000), fato atribuído aos ciclos anovulatórios naquelas com maior IMC e, portanto, menor exposição hormonal (KEY e PIKE, 1988).

Foi encontrada associação entre alguns fatores de risco e o Ca de mama, e foi estimado o número de mortes associado ao fator. Cerca de 5 % dos casos de Ca de mama no mundo foram atribuídos ao consumo de álcool, com cerca de 26.000 mortes. Para a variável sobrepeso e obesidade, foram respectivamente 9 % e 43.000 mortes, e inatividade física foi responsável por 10 % e 45.000 mortes. Em PAR, a associação entre o Ca de mama e o consumo de álcool, sobrepeso e obesidade foi maior em relação aos PMR e PBR. Este estudo também evidenciou a diferença da mortalidade pelo Ca de mama relacionado aos fatores de risco de acordo com a renda do país de origem. Nas mulheres de PAR com idade tanto entre 30 e 69 anos quanto com mais de 70 anos, a maior mortalidade é relacionada a esses fatores de risco (22 %) em relação às mulheres da mesma faixa etária dos PMR e PBR (18 %) (DANAEI *et al.*, 2005).

Quando avaliadas mulheres filipinas e japonesas que migraram para países ocidentais, foi observada a elevação da incidência de câncer de mama, mostrando que a adesão ao estilo de vida ocidental representou nessa população importante fator de risco para o desenvolvimento dessa patologia (MCCRACKEN *et al.*, 2007).

Atualmente a dieta pobre em vitaminas e antioxidantes está relacionada a condições que cursam com aumento do estresse oxidativo celular, podendo alterar a expressão gênica e assim mecanismos de proliferação celular. A vitamina E, e outros micronutrientes antioxidantes, como o ácido ascórbico e o retinol, devido a suas possíveis ações de proteção celular contra radicais livres e os danos aos DNA, são o

foco atual de estudos de prevenção de doenças como o câncer de mama (PELUZIO e COSTA, 2008; ABRANCHES *et al.*, 2011)

2.5.6 Fatores Reprodutivos e Hormonais

Já está bem estabelecida a correlação entre os fatores relacionados aos hormônios e o aumento da incidência do Ca de mama. Condições que cursam com maior exposição a níveis hormonais elevados (como os que ocorrem durante a fase reprodutiva da mulher) são consideradas de risco aumentado para o desenvolvimento dessa patologia, como menarca precoce (<12 anos), menopausa tardia (>50 anos), nuliparidade, ausência de amamentação, terapia de reposição hormonal, entre outras. Esses fatores contribuem por alterar o número de ciclos ovulatórios durante a vida da mulher, afetando a exposição cumulativa aos hormônios ao longo da vida (CHAVEZ-MACGREGOR *et al.*, 2005). Nuliparidade e elevado IMC já foram relacionados a elevações nos níveis de estrógenos e testosterona circulantes em mulheres pós-menopausadas (LAMAR *et al.*, 2003), condições estas relacionadas ao aumento da exposição aos hormônios.

A avaliação de fatores de risco realizada em um estudo com americanas, com 7.508 mulheres entre 1982 e 1987, sugeriu que a idade avançada da mulher por ocasião do nascimento do primeiro filho e a nuliparidade seriam responsáveis por 29,5 % dos casos, a alta renda por 18,9 % e a história familiar de câncer de mama por 9,1 %. Juntos, esses fatores seriam responsáveis por até 47 % dos casos na população americana (MADIGAN *et al.*, 1995).

A nuliparidade aumenta o risco de Ca de mama quando comparada às mulheres com filhos (LACEY JR *et al.*, 2009). Sugere-se que a redução do risco é proporcional ao número de filhos e à idade da primeira gestação. Mulheres com múltiplos partos e com o primeiro parto jovem (20 anos) tiveram o risco reduzido de desenvolver Ca de mama em relação às mulheres nulíparas (COLDITZ e ROSNER, 2000).

A amamentação tem um efeito protetor conhecido (STUEBE, 2009; STUEBE *et al.*, 2009). Quanto mais tempo a mulher amamentar, maior é a proteção (SKEGG *et al.*, 2002; GHIASVAND *et al.*, 2010), apesar de ainda controverso (STUVER *et al.*, 1997; STUEBE *et al.*, 2009). A amamentação está relacionada a períodos de amenorréia, além da lactogênese levar à diferenciação terminal do tecido mamário, com potenciais benefícios em relação à malignização de células do tecido mamário (STUEBE, 2009). É descrita também a diferença no padrão de amamentação entre as mulheres de países

desenvolvidos e em desenvolvimento, com taxas de amamentação menores além de curto período de amamentação nos primeiros (SKEGG *et al.*, 2002).

Menarca precoce e menopausa tardia estão relacionadas ao risco aumentado de Ca de mama, enquanto que a paridade está relacionada ao efeito protetor, variando conforme a idade do primeiro parto (COLDITZ e ROSNER, 2000).

Em relação à menarca, o atraso de dois anos corresponderia à redução de risco de 10 %, tanto para mulheres menopausadas quanto em pós-menopausadas, assim como a idade da menopausa. As mulheres com diferença da idade da menopausa de cinco anos teriam um risco aumentado em até 17 % de desenvolver Ca de mama (HSIEH *et al.*, 1990).

As mulheres que tiveram menopausa natural e não fizeram terapia de reposição hormonal (TRH) apresentaram um risco aumentado em 2,6 % ao ano. Aquelas que fizeram TRH com estrogênio isolado tiveram um aumento de 7,7 % por ano de uso, enquanto as que fizeram uso combinado de estrogênio e progesterona tiveram um aumento ainda maior, que chegou a 13 % ao ano de uso (COLDITZ e ROSNER, 2000; LACEY JR *et al.*, 2009).

O uso de anticoncepcional oral (ACO) como um fator de risco para o Ca de mama ainda é um tema controverso. Estudos sugeriram aumento de risco de Ca de mama em usuárias de ACO, tanto nos diagnósticos em idade precoce (ROSENBERG *et al.*, 2009), quanto nas mulheres afro-americanas, e principalmente para o subtipo de tumor com receptor de estrógeno e progesterona negativo (GHASVAND *et al.*, 2010; ROSENBERG *et al.*, 2010).

2.5.7 Fatores Socioeconômicos

Essa doença, ao contrário de outros tumores, está relacionada ao processo de urbanização da sociedade, com taxas de incidência maiores nas mulheres com elevado *status* socioeconômico (FAN *et al.*, 2009; TORIO *et al.*, 2010).

As mulheres com elevado nível socioeconômico (NSE) têm maior risco de Ca de mama. Esse aumento de risco é compensado pela menor mortalidade entre mulheres de classe social elevada em relação àquelas de menor instrução, cuja doença em geral é diagnosticada em fases mais avançadas, portanto com pior prognóstico (HECK e PAMUK, 1997; ADAMS *et al.*, 2004).

2.5.8 Radiação ionizante

A exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, aumenta o risco de desenvolver câncer de mama, particularmente durante a puberdade, época em que os ductos e lóbulos ainda não concluíram sua diferenciação. O câncer de mama é um tipo comum de neoplasia que acomete crianças sobreviventes de câncer, particularmente as que foram previamente irradiadas no tórax, como no caso das portadoras de Linfoma de Hodgkin (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009b; a).

2.5.9 História Familiar de Ca de mama e Genética

A história familiar de Ca de mama positiva está fortemente associada ao risco elevado de desenvolver essa patologia (COLDITZ e ROSNER, 2000; SKEGG *et al.*, 2001; KRUK, 2007; LACEY JR *et al.*, 2009)

Entre 15 e 20 % das mulheres com Ca de mama têm história familiar positiva. A cada nove mulheres diagnosticadas com Ca de mama, oito têm história familiar negativa. Das que têm casos na família, a maioria não irá desenvolver Ca de mama, e, se desenvolverem há maior chance de que seja após os 50 anos (SKEGG *et al.*, 2001).

A presença de um parente de primeiro grau com Ca de mama aumenta o risco em 1,8 vez. Se forem dois parentes, o risco aumenta para 2,93 vezes, e 3,9 vezes se tiver três familiares acometidos. Quanto mais jovem o familiar acometido, maior é o risco. Se o familiar tiver menos de 30 anos, o risco é de 2,9, enquanto que se a idade for maior que 60 anos o risco é de 1,5 vez (SKEGG *et al.*, 2001).

A presença de mutação nos genes *brcA1* e *brcA2* aumenta o risco em até 85 % de desenvolver câncer de mama até os 70 anos de idade, além de aumentar o risco de desenvolver Ca de ovário na mesma população (PONDER, 2001). O risco é ainda maior se houver casos na família diagnosticados com idade jovem (inferior a 35 anos) (ANTONIOU *et al.*, 2003). A presença de mutação de *brcA2* aumenta ainda o risco de outros tumores na próstata, no estômago e no pâncreas. Mulheres com diagnóstico de Ca de mama com mutação de *brcA2* têm risco de desenvolver até os 70 anos doença na mama contralateral em 52,3 %, e Ca de ovário em 15,9 % (CONSORTIUM, 1999). Para a presença de mutação no *brcA1*, o risco cumulativo até os 80 anos é de 90 % e 24 % para Ca de mama e ovário, respectivamente, além de risco aumentado em portadores para outros tipos de câncer, como o de estômago (RISCH *et al.*, 2006).

2.5.10 Fatores protetores

São considerados fatores de proteção a prática de atividade física e alimentação saudável com a manutenção do peso corporal, pois estão associadas ao menor risco de desenvolver esse tipo de câncer (VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000; HOLMES *et al.*, 2005; ELIASSEN *et al.*, 2006; MONNINKHOF *et al.*, 2007; IRWIN *et al.*, 2008; MARUTI *et al.*, 2008; AGURS-COLLINS *et al.*, 2009).

2.6 Fatores prognósticos

Apesar do aprimoramento do conhecimento científico e do desenvolvimento terapêutico, assim como em outros tipos de câncer, o principal impacto prognóstico e a mais efetiva intervenção clínica são o diagnóstico precoce.

O *screenig* ou rastreamento é realizado em população assintomática. No caso do câncer de mama, tem-se como opção o exame físico das mamas (palpação) e exames de imagem, como a mamografia, ambos com uma boa relação custo-benefício e de fácil realização. Ainda não existe para o Ca de mama nenhum marcador tumoral efetivo para diagnóstico. Estudos que avaliaram o impacto da mamografia na redução dos óbitos por Ca de mama em população europeia chegaram a valores entre 20 e 50 % de redução de mortalidade (PACI *et al.*, 2002; PULITI *et al.*, 2008).

Apenas mulheres com história familiar de Ca de mama fortemente positiva nos EUA são encaminhadas para pesquisa de mutação do gene *brcA1* e 2 no cromossomo 17 e 13, respectivamente, e aconselhamento genético (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009b; a). Isso ainda não é a realidade para a maioria das brasileiras, devido ao alto custo dos exames e à dificuldade de aconselhamento genético nessa população.

Segundo o Consenso Nacional do Câncer de Mama (recomendação do Ministério da Saúde), o rastreamento anual, por meio do exame clínico da mama, deve ser realizado em todas as mulheres a partir de 40 anos. O rastreamento mamográfico deve ser realizado em mulheres com idade entre 50 e 69 anos, com o intervalo máximo de dois anos entre os exames. Para aquelas pertencentes aos grupos de risco elevado, exame clínico da mama e mamografia devem ser anuais, a partir dos 35 anos (INCA e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Os critérios para a definição de pacientes de alto risco são a presença de história familiar (HF) de pelo menos um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com a doença com idade inferior a 50 anos na época do diagnóstico, HF de no mínimo um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com diagnóstico de câncer de mama bilateral ou câncer de ovário, independente da idade na época do diagnóstico; HF de Ca

de mama masculino e diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ* (INCA e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

De acordo com Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia (X Reunião-2008), o exame clínico das mamas deve começar a partir dos 20 anos ou do início do uso de contraceptivos orais. A mamografia deve ser realizada anualmente em mulheres assintomáticas a partir dos 40 anos, em mulheres de alto risco após 35 anos, e em mulheres com predisposição genética após os 25 anos (SBM e MASTOLOGIA, 2008).

Nos EUA, a redução da mortalidade por Ca de mama é atribuída à mamografia em mulheres de 40 a 70 anos, assim como ao exame clínico das mamas. O auto exame não é considerado medida que produz impacto na mortalidade nos EUA (NCI e NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011b).

2.7 Frações Livres de DNA (FLDNA)

Em 1953, James Watson e Francis Crick determinaram a estrutura do DNA. Este consiste de duas cadeias de polinucleotídeos, cada uma delas composta por quatro tipos de nucleotídeo (desoxirribose) ligada a um grupo fosfato e a uma base (adenina, citosina, guanina ou tiamina). Elas se unem através de pontes de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos, de maneira complementar, e se torcem, formando assim a dupla hélice característica. A molécula de DNA está associada às proteínas para que seja compactada e para formar o cromossomo, cuja função é portar os genes, que é um segmento de DNA que contém informações para a produção de determinada proteína. As proteínas que se ligam ao DNA para sua compactação são as histonas e não-histonas. As histonas são responsáveis pelo primeiro nível de compactação do DNA, o nucleossomo (octâmero de histonas envolvido por duas voltas da dupla fita de DNA, aproximadamente 200 pares de nucleotídeos) (ALBERTS *et al.*, 2007a).

O GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (GAL *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2007a; EL TARHOUNY *et al.*, 2008; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010), a β -actina (ELLINGER *et al.*, 2009; HAUSER *et al.*, 2010) e a β -globina (GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; ELLINGER *et al.*, 2009; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010) são exemplos de genes utilizados para a identificação das FLDNA no soro ou no plasma.

Desde 1948, é descrita na literatura a presença de FLDNA no plasma ou soro sanguíneo em humanos (MANDEL e METAIS, 1948). Esses fragmentos são fragmentos de DNA extracelular, encontrado tanto em indivíduos saudáveis quanto em estados patológicos (DAVIS e DAVIS IV, 1973; COX e GOKCEN, 1976). Em 1977, foram relacionados aos pacientes com neoplasias, encontrado FLDNA em

concentrações mais elevadas em pacientes com diversos tipos de câncer (mama, pulmão, cólon, genitais femininos, geniturinário e trato gastrointestinal, dentre outros), com redução após radioterapia (LEON *et al.*, 1977).

FLDNA foram encontrados tanto em plasma (FOURNIÉ *et al.*, 1993; GIACONA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2006; KAMAT *et al.*, 2010), quanto no soro (GAL *et al.*, 2004; GAHAN e SWAMINATHAN, 2008; GANG *et al.*, 2010) de pessoas saudáveis e em estados patológicos diversos. Apesar de a concentração de FLDNA no soro ser maior em relação ao plasma, isso é atribuído à lise de leucócitos durante o processo de coagulação no tubo coletor, *in vitro*, não correspondendo, portanto, à real fração de FLDNA produzida *in vivo* (LEE *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais esses fragmentos livres são encontrados nesses indivíduos ainda não estão completamente estabelecidos, já que não estão associados exclusivamente às condições patológicas, pois são encontrados em indivíduos saudáveis e em pessoas idosas (STEINMAN, 1975; FOURNIÉ *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2001; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010).

A determinação de fragmentos genômicos em sangue periférico foi utilizada na tentativa de prever aquelas gestantes que possuíam risco aumentado de desenvolver pré-eclâmpsia ao final da gestação (ZHONG *et al.*, 2007b; LAZAR *et al.*, 2009), ou mesmo como possibilidade de diagnóstico pré-natal não invasivo (CHEN *et al.*, 2008; TUAEVA *et al.*, 2008; LO, 2000).

Esse fenômeno também foi observado em vários estados patológicos como lúpus (RAPTIS e MENARD, 1980; SAUKKONEN *et al.*, 2007), pacientes internados em unidade de terapia intensiva (SAUKKONEN *et al.*, 2007), transplantes de órgãos (CASTLEBERRY *et al.*, 2011) e envelhecimento (TONG e LO, 2006; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010).

Entre pacientes com câncer, foi descrita a presença de FLDNA associada aos diversos tipos de neoplasias, como no de pulmão (SOZZI *et al.*, 2003), de pâncreas (GIACONA *et al.*, 1998), de testículo (ELLINGER *et al.*, 2008b; ELLINGER *et al.*, 2009), de rins (SCHWARZENBACH *et al.*, 2009; GANG *et al.*, 2010), de próstata (SCHWARZENBACH *et al.*, 2009; ELLINGER *et al.*, 2011) e de mama (SILVA *et al.*, 1999; GAL *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2007a; KOHLER *et al.*, 2009), com níveis aumentados em pacientes quando comparados aos controles saudáveis.

Em pacientes com neoplasia de mama, em 1999, foram correlacionadas alterações de microssatélite em 35% das pacientes em tecido tumoral e em 15% das pacientes em FLDNA, e ausência dessas alterações em pacientes com doença benigna

(CHEN *et al.*, 1999). No mesmo ano, foi demonstrado que em 90% das amostras estudadas (56 casos) foi encontrado pelo menos um evento molecular no DNA tumoral, e 66% (41 casos) possuíam alteração similar no DNA plasmático (SILVA *et al.*, 1999).

Em 2007, foi avaliada a relação entre as FLDNA e pacientes portadoras de doença de mama maligna, benigna e controles saudáveis, observando diferença estatística entre valores encontrados. Aquelas pacientes com tumores malignos (Ca de mama) apresentaram os maiores níveis, as portadoras de doença benigna (DBM) com valores intermediários enquanto que os controles saudáveis (CS) tinham os menores valores, com significância estatística na diferença entre os grupos (ZHONG *et al.*, 2007a). Na tentativa de buscar um marcador biológico, foi avaliada a correlação entre os níveis de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), de seu receptor VEGFR1 circulante e de FLDNA em pacientes com neoplasia de mama, doença benigna e controles saudáveis, a partir da observação da elevação dos níveis de VEGF e de FLDNA em pacientes com diversas neoplasias. Não foi demonstrada correlação dos níveis de VEGF e VEGFR1 com a presença do tumor de mama, mas demonstrou-se correlação positiva entre a elevação da FDNA em pacientes com doença benigna e neoplasia de mama (e negativa nos controles saudáveis). Esse estudo não encontrou diferença dos níveis de FLDNA entre os casos benignos e malignos de patologias mamárias, como descrito anteriormente (EL TARHOUNY *et al.*, 2008).

Ao avaliar as FLDNA nuclear e mitocondrial entre pacientes com Ca de mama, DBM e CS, foi encontrada FLDNA nuclear com níveis mais elevados que as FLDNA mitocondriais, possibilitando a diferenciação entre Ca de mama e CS. As pacientes com Ca de mama apresentaram os maiores níveis, enquanto que as de DBM e CS tiveram níveis semelhantes. Em relação à dosagem das FLDNA mitocondriais, esta apresentava níveis menores, e foram capazes de diferenciar entre o grupo de tumores (Ca de mama e DBM) do CS (KOHLENER *et al.*, 2009).

Estudo com indivíduos saudáveis encontrou características que sugeriram que a origem dessas FLDNA era da apoptose celular, como tamanho dos fragmentos entre 180 e 500 pares de base (pb), característicos de apoptose e não de necrose celular (10000 pb), e pela presença em 378 clones, de aproximadamente 69,6% provenientes de regiões de intervenção dos genes, 25,0% e 2,9% de íntrons e de exons, respectivamente. Esses valores se assemelham aos encontrados no DNA celular, com 24%, 1% e 75% de íntrons, éxons e regiões de intervenção, indicando uma fragmentação aleatória, semelhante ao padrão encontrado na apoptose (SUZUKI *et al.*, 2008).

Em pacientes com Ca de pâncreas, também foi demonstrado que as FLDNA tinham origem na apoptose celular, pela presença do padrão em escada dos fragmentos encontrados livres no plasma, cuja fragmentação ocorria entre os nucleossomos (padrão encontrado na apoptose celular) (GIACONA *et al.*, 1998). Em cultura de células *in vitro*, foi demonstrada a diferença na liberação de fragmentos de DNA após necrose e apoptose celular. Enquanto na apoptose ocorreria uma liberação maior de FLDNA, a necrose celular espontaneamente não liberaria DNA. Na presença de macrófagos, comum em ambos os processos, houve maior liberação desses fragmentos após necrose celular, demonstrando, *in vitro*, que reações metabólicas nessas culturas após a necrose celular poderiam ser responsáveis por reduzir o tamanho dos fragmentos encontrados (CHOI *et al.*, 2005).

Outra possibilidade de utilização desse marcador é o uso da dosagem de FDNA para quantificar a carga tumoral, ou para a pesquisa de mutações específicas tumorais em sangue periférico, correlacioná-lo com diagnóstico ou prognóstico dos pacientes, como na detecção de *Kras* mutado em sangue periférico de pacientes com Ca de pâncreas (SORENSEN *et al.*, 1994), na pesquisa de hipermetilação generalizada no DNA em pacientes com neoplasia de bexiga e sua relação com evolução desfavorável desses pacientes (ELLINGER *et al.*, 2008a), além da pesquisa de instabilidade genômica nas FLDNA em pacientes com neoplasia de pulmão do tipo pequenas células (CUDA *et al.*, 2000).

A extração de DNA pode ser realizada a partir de diferentes fluidos corporais (SILVA *et al.*, 1999; SOZZI *et al.*, 2003; KORABECNA *et al.*, 2008), sendo o mais comum sangue periférico, plasma ou soro (STEINMAN, 1975; LEON *et al.*, 1977; LEE *et al.*, 2001; GAL *et al.*, 2004; BREMNES *et al.*, 2005; ELLINGER *et al.*, 2008b; GAHAN e SWAMINATHAN, 2008; LAZAR *et al.*, 2009; GANG *et al.*, 2010).

Apesar das dificuldades iniciais, foram demonstradas essas FLDNA pelos métodos como radioimunoensaio (LEON *et al.*, 1977), imunoeletroforese (DAVIS e DAVIS IV, 1973), citometria (ou citômetro) de fluxo (TUAEVA *et al.*, 2008), espectrofotômetro (CHUN *et al.*, 2006) e gel de poli(acrilamida) (CUDA *et al.*, 2000). Atualmente o mais utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR), principalmente a PCR quantitativa, possibilitando a detecção de quantidades mínimas, impossíveis de serem detectadas pelos métodos anteriormente utilizados (GAL *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2007b).

Um fator de confusão com possível influência no valor encontrado dessas FLDNA são os atrasos no processamento das amostras, a temperatura de conservação, o adequado armazenamento, além do congelamento e descongelamento das amostras.

Em relação à metodologia para extração do DNA, de acordo com a literatura consultada neste trabalho, existe uma variedade de *kits* comerciais utilizados para este fim, além da utilização de diferentes genes para a quantificação desses fragmentos (ZHONG *et al.*, 2007a; ELLINGER *et al.*, 2009; GANG *et al.*, 2010; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010; KAMAT *et al.*, 2010), o que poderia explicar a diferença entre os valores encontrados nos diferentes estudos. Apesar dessa variação, os resultados são consistentes e sugerem uma elevação das FLDNA em diferentes tipos de neoplasias.

Para melhor avaliar os resultados, o ideal seria que a metodologia usada fosse semelhante nos diversos trabalhos, a fim de padronizar a melhor maneira de extração e quantificação de FLDNA, para que esse método de diagnóstico e acompanhamento de diversas patologias possa ser usado em escala populacional. As diferenças no processo de extração e quantificação das FLDNA entre as publicações ainda não permitem a padronização da metodologia, mas sugere que, em breve, este possa ser mais uma opção de rastreamento ou de preditor prognóstico em pacientes com patologias diversas, incluindo o câncer.

2.8 Referências Bibliográficas

ABRANCHES, M. V., MENDES, M. C. S., PELUZIO, M. C., *et al.* Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer
European Journal of Cancer Prevention. 2011

ABRANCHES, M. V.; MENDES, M. C. S.; PELUZIO, M. C.; RIBEIRO, S. M.; FRANCESCHINI, S. C.; DE PAULA, S. O.; DE FREITAS, R. N. Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer
European Journal of Cancer Prevention, 2011

ADAMS, J.; WHITE, M.; FORMAN, D. Are there socioeconomic gradients in stage and grade of breast cancer at diagnosis? Cross sectional analysis of UK cancer registry data. **British Medical Journal**, v. 329, n. 7458, p. 142, July 17, 2004 2004.

AGURS-COLLINS, T.; ROSENBERG, L.; MAKAMBI, K.; PALMER, J. R.; ADAMS-CAMPBELL, L. Dietary patterns and breast cancer risk in women participating in the Black Women's Health Study. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 90, p. 621-8, 2009.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (Eds.) **Fundamentos da Biologia Celular**. São Paulo: ARTMED EDITORA, 2.ed ed. 2007a.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (Eds.) **Biologia Molecular da Célula**. Porto alegre: Artmed, p.1584, 4ª Edição ed. 2007b.

AMENDOLA, L.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2009a.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2009*. 2009b.

ANTONIOU, A.; PHAROAH, P. D. P.; NAROD, S.; RISCH, H. A.; EYFJORD, J. E.; HOPPER, J. L.; LOMAN, N.; OLSSON, H.; JOHANNSSON, O.; BORG, A.; PASINI, B.; RADICE, P.; MANOUKIAN, S.; ECCLES, D. M.; TANG, N.; OLAH, E.; ANTON-CULVER, H.; WARNER, E.; LUBINSKI, J.; GRONWALD, J.; GORSKI, B.; TULINIUS, H.; THORLACIUS, S.; EEROLA, H.; NEVANLINNA, H.; SYRJÄKOSKI, K.; KALLIONIEMI, O. P.; THOMPSON, D.; EVANS, C.; PETO, J.; LALLOO, F.; EVANS, D. G.; EASTON, D. F. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 5, p. 1117-30, 2003.

BARTELLA, L.; SMITH, C. S.; DERSHAW, D. D.; LIBERMAN, L. Imaging Breast Cancer. **Radiologic clinics of North America**, v. 45, n. 1, p. 45-67, 2007.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 229 - 239, 2004.

BREMNES, R. M.; SIRERA, R.; CAMPS, C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? **Lung Cancer**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2005.

CASTLEBERRY, C. D.; HIDESTRAND, M.; TOMITA-MITCHELL, A.; ELLIS, T. M.; LIANG, H. L.; HARRIS, S.; GOETSCH, M.; STENDAHL, G.; HOFFMANN, R.; SHAMES, B.; TWEDDELL, J.; ZANGWILL, S.; MITCHELL, M. E. 407 Quantification of Circulating Cell-Free DNA in Pediatric Heart Transplant Recipients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 30, n. 4, Supplement 1, p. S139-S139, 2011.

CDC; PREVENTION, C. F. D. C. A. Leading Causes of Death, 1900-1998. v. 2011. n. 15/06/20112000. p. http://www.cdc.gov/nchs/data/dvs/lead1900_98.pdf
<http://wonder.cdc.gov/wonder/help/cmfm.html#Compressed> Mortality File: Archives of Previous Releases.

CDC; PREVENTION, C. F. D. C. A.; HEALTHSTATISTICS, N. C. F.; SERVICES, U. D. O. H. A. H. *HEALTH, UNITED STATES, 2010*. United States: CDC, 2010.

CHAVEZ-MACGREGOR, M.; ELIAS, S. G.; ONLAND-MORET, N. C.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; VAN GILS, C. H.; MONNINKHOF, E.; GROBBEE, D. E.; PEETERS, P. H. M. Postmenopausal Breast Cancer Risk and Cumulative Number of Menstrual Cycles. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 4, p. 799-804, April 1, 2005 2005.

CHEN, X.; REN, J. H.; GUO, H.; LIN, L. H.; YAO, Q. X. Cell-free fetal DNA detection in maternal plasma using real-time PCR and cycling probe technology for prenatal screening beta-thalassaemia major. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 28, n. 7, p. 1210-3, 2008.

CHEN, X. Q.; BONNEFOI, H.; DIEBOLD-BERGER, S.; LYAUTEY, J.; LEDERREY, C.; FALTIN-TRAUB, E.; STROUN, M.; ANKER, P. Detecting Tumor-related Alterations in Plasma or Serum DNA of Patients Diagnosed with Breast Cancer1. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 2297-2303, 1999.

CHOI, J.-J.; REICH, C. F.; PISETSKY, D. S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 55-62, 2005.

CHUN, F. K. H.; MÜLLER, I.; LANGE, I.; FRIEDRICH, M. G.; ERBERSDOBLER, A.; KARAKIEWICZ, P. I.; GRAEFEN, M.; PANTEL, K.; HULAND, H.; SCHWARZENBACH, H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. **British Journal of Urology International**, v. 98, n. 3, p. 544-548, 2006.

COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. Cumulative Risk of Breast Cancer to Age 70 Years According to Risk Factor Status: Data from the Nurses' Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 10, p. 950-964, November 15, 2000 2000.

CONSORTIUM, T. B. C. L. Cancer Risks in BRCA2 Mutation Carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 15, p. 1310-1316, August 4, 1999 1999.

COX, R. A.; GOKCEN, M. Circulating DNA levels in man. **Biochemical Medicine**, v. 15, n. 2, p. 126-137, 1976.

CUDA, G.; GALLELLI, A.; NISTICO, A.; TASSONE, P.; BARBIERI, V.; TAGLIAFERRI, P. S.; COSTANZO, F. S.; TRANFA, C. M. E.; VENUTA, S. Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in serum DNA of small and non-small cell lung cancer patients: a tool for early diagnosis? **Lung Cancer** v. 30, p. 211-214, 2000.

DANAEI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784-1793, 2005.

DAVIS, G. L.; DAVIS IV, J. S. Detection of circulating dna by counterimmunoelectrophoresis (cie). **Arthritis & Rheumatism**, v. 16, n. 1, p. 52-58, 1973.

DEVITTA JR, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (Eds.) **Cancer, Principles e Praticce of Oncology**: Lippincott Williams e Wilkins, v.1, p.2898, 7th edition ed. 2005.

DIAB, S.; CLARK, G.; OSBORNE, C.; LIBBY, A.; ALLRED, D.; ELLEDGE;RM. Tumor Characteristics and Clinical Outcome of Tubular and Mucinous Breast Carcinomas **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1442, 1999.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F. L.; TROTTI, A. **American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual**. 7th Edition. ed. New York, NY: Springer 2010.

EL TARHOUNY, S.; SEEFELD, M.; FAN, A. X.-C.; HAHN, S.; HOLZGREVE, W.; ZHONG, X. Y. Comparison of serum VEGF and its soluble receptor sVEGFR1 with serum cell-free DNA in patients with breast tumor. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 65-69, 2008.

ELIASSEN, A. H.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; WILLETT, W. C.; HANKINSON, S. E. Adult Weight Change and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 2, p. 193-201, July 12, 2006 2006.

ELLINGER, J.; KASSEM, N. E.; HEUKAMP, L. C.; MATTHEWS, S.; CUBUKLUOZ, F.; KAHL, P.; PERABO, F. G.; MÜLLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Hypermethylation of Cell-Free Serum DNA Indicates Worse Outcome in Patients With Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 179, p. 346-352, 2008a.

ELLINGER, J.; MÜLLER, S. C.; STADLER, T. C.; JUNG, A.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of

prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 2, p. 124-129, 2011.

ELLINGER, J.; WITTKAMP, V.; ALBERS, P.; PERABO, F. G. E.; MUELLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Cell-free DNA in Serum: a Novel Diagnostic Marker for Patients with Testicular Cancer. **European Urology Supplements**, v. 7, n. 3, p. 83-83, 2008b.

ELLINGER, J.; WITTKAMP, V.; ALBERS, P.; PERABO, F. G. E.; MUELLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Cell-Free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients With Testicular Germ Cell Cancer. **The Journal of Urology**, v. 181, n. 1, p. 363-371, 2009.

FAN, L.; ZHENG, Y.; YU, K.-D.; LIU, G.-Y.; WU, J.; LU, J.-S.; SHEN, K.-W.; SHEN, Z.-Z.; SHAO, Z.-M. Breast cancer in a transitional society over 18 years: trends and present status in Shanghai, China. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 117, n. 2, p. 409-416, 2009.

FILHO, G. B. (Ed.) **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7ª edição ed. 2006.

FOURNIÉ, G. J.; MARTRES, F.; POURRAT, J. P.; ALARY, C.; RUMEAU, M. Plasma DNA as Cell Death Marker in Elderly Patients. **Gerontology** v. 39, p. 215-221, 1993.

GAHAN, P. B.; SWAMINATHAN, R. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1137, n. 1, p. 1-6, 2008.

GAL, S.; FIDLER, C.; LO, Y. M. D.; TAYLOR, M.; HAN, C.; MOORE, J.; HARRIS, A. L.; WAINSCOAT, J. S. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. **British Journal Cancer**, v. 90, n. 6, p. 1211-1215, 2004.

GANG, F.; GUORONG, L.; AN, Z.; ANNE, G. P.; CHRISTIAN, G.; JACQUES, T. Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-free DNA in Serum. **Urology**, v. 75, n. 2, p. 262-265, 2010.

GHIASVAND, R.; MARAM, E. S.; TAHMASEBI, S.; TABATABAEE, S. H. R. Risk factors for breast cancer among young women in southern Iran. **International Journal of Cancer**, p. n/a-n/a, 2010.

GIACONA, M. B.; RUBEN, G. C.; ICZKOWSKI, K. A.; ROOS, T. B.; PORTER, D. M.; SORENSON, G. D. Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. **Pancreas**, v. 17, n. I, p. 89-97, 1998.

HAUSER, S.; ZAHALKA, T.; ELLINGER, J.; FECHNER, G.; HEUKAMP, L. C.; VON RUECKER, A.; MÜLLER, S. C.; BASTIAN, P. J. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer. **Anticancer Research**, v. 30, n. 7, p. 2785-2789, 2010.

HECK, K. E.; PAMUK, E. R. Explaining the Relation Between Education and Postmenopausal Breast Cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, n. 4, p. 366-372, February 15, 1997 1997.

HOLMES, M. D.; CHEN, W. Y.; FESKANICH, D.; KROENKE, C. H.; COLDITZ, G. A. Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 20, p. 2479-2486, May 25, 2005 2005.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M. P.; LEWIS, D. R.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; CRONIN, K. A.; EDWARDS, B. K. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. In: BETHESDA, M. (Ed.). v. 2011. n. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011: National Cancer Institute, 2009.

HSIEH, C.-C.; TRICHOPOULOS, D.; KATSOUYANNI, K.; YUASA, S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: Associations and interactions in an international case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 5, p. 796-800, 1990.

HUANG, Z. H.; LI, L. H.; HUA, D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. **Cancer Letters**, v. 243, n. 1, p. 64-70, 2006.

INCA. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. 2009.

INCA. Cancer no Brasil/ Dados do Registro de Base Populacional,. v. 2011. n. 13/06/20112010. p. <http://www1.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/>.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 50, n. 2 p. 77-90, 2004.

INCA, I. N. D. C. ATLAS DE MORTALIDADE POR CÂNCER NO BRASIL 1979-1999. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. (Ed.). Rio de Janeiro: INCA, 2002.

IRWIN, M. L.; SMITH, A. W.; MCTIERNAN, A.; BALLARD-BARBASH, R.; CRONIN, K.; GILLILAND, F. D.; BAUMGARTNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BERNSTEIN, L. Influence of Pre- and Postdiagnosis Physical Activity on Mortality in Breast Cancer Survivors: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 26, n. 24, p. 3958-3964, August 20, 2008 2008.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics, 2010. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 5, p. 277-300, 2010.

JYLHÄVÄ, J.; KOTIPELTO, T.; RAITALA, A.; JYLHÄ, M.; HERVONEN, A.; HURME, M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: The Vitality 90+ study. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 1-2, p. 20-26, 2010.

KAMAT, A. A.; BALDWIN, M.; URBAUER, D.; DANG, D.; HAN, L. Y.; GODWIN, A.; KARLAN, B. Y.; SIMPSON, J. L.; GERSHENSON, D. M.; COLEMAN, R. L.; BISCHOFF, F. Z.; SOOD, A. K. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer. **Cancer**, v. 116, n. 8, p. 1918-1925, 2010.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Nutrition and breast cancer. **The Breast**, v. 12, n. 6, p. 412-416, 2003.

KEY, T. J. A.; PIKE, M. C. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 29-43, 1988.

KLUTTIG, A.; POKRZYWNIAK, A. S. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. **Breast Care**, v. 4 p. 82-87, 2009.

KOHLER, C.; RADPOUR, R.; BAREKATI, Z.; ASADOLLAHI, R.; BITZER, J.; WIGHT, E.; BÜRKI, N.; DIESCH, C.; HOLZGREVE, W.; ZHON, X. Y. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 105, 2009.

KORABECNA, M.; OPATRNA, S.; WIRTH, J.; RULCOVA, K.; EISELT, J.; SEFRNA, F.; HORINEK, A. Cell-Free Plasma DNA during Peritoneal Dialysis and Hemodialysis and in Patients with Chronic Kidney Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1137, p. 296-301 2008.

KRUK, J. Lifetime physical activity and the risk of breast cancer: A case-control study. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, n. 1, p. 18-28, 2007.

LACEY JR, J. V.; KREIMER, A. R.; BUYS, S. S.; MARCUS, P. M.; CHANG, S. C.; LEITZMANN, M. F.; HOOVER, R. N.; PROROK, P. C.; BERG, C. D.; HARTGE, P. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9 p. 84, 2009.

LAMAR, C. A.; DORGAN, J. F.; LONGCOPE, C.; STANCZYK, F. Z.; FALK, R. T.; STEPHENSON, H. E. Serum Sex Hormones and Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 12, n. 4, p. 380-383, April 1, 2003 2003.

LAZAR, L.; RIGO, J.; NAGY, B.; BALOGH, K.; MAKO, V.; CERVENAK, L.; MEZES, M.; PROHASZKA, Z.; MOLVAREC, A. Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. **BMC Medical Genetics**, v. 10, n. 1, p. 120, 2009.

LEE, T.-H.; MONTALVO, L.; CHREBTOW, V.; BUSCH, MICHAEL P. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. **Transfusion**, v. 41, n. 2, p. 276-282, 2001.

LEON, S. A.; SHAPIRO, B.; SKLAROFF, D. M.; YAROS, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. **Cancer Research**, v. 37, n. 3, p. 646-650, March 1, 1977 1977.

LO, Y. M. D. Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 1903-1906, 2000.

MADIGAN, M. P.; ZIEGLER, R. G.; BENICHO, J.; BYRNE, C.; HOOVER, R. N. Proportion of Breast Cancer Cases in the United States Explained by Well-Established Risk Factors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 22, p. 1681-1685, November 15, 1995 1995.

MANDEL, P.; METAIS, T. P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, v. 142 p. 241-243, 1948.

MARUTI, S. S.; WILLETT, W. C.; FESKANICH, D.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. A. A Prospective Study of Age-Specific Physical Activity and Premenopausal Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 10, p. 728-737, May 21, 2008 2008.

MATHERS, C.; BOERMA, T.; FAT, D. M. (Eds.) **THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2004 UPDATE**. Switzerland: World Health Organizationed. 2008.

MCCRACKEN, M.; OLSEN, M.; CHEN, M. S., JR.; JEMAL, A.; THUN, M.; COKKINIDES, V.; DEAPEN, D.; WARD, E. Cancer Incidence, Mortality, and Associated Risk Factors Among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese Ethnicities. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n. 4, p. 190-205, July 1, 2007 2007.

MONNINKHOF, E.; ELIAS, S.; VLEMS, F.; VAN, D.; SCHUIT, A.; VOSKUIL, D.; VAN LEEUWEN, F. Physical activity and breast cancer: a systematic review. **Epidemiology**, v. 18, p. 137 - 157, 2007.

NCI; NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer. v. 2011. n. 24/06/20112011a. p. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>.

NCI; NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer Screening. In: HAROLD VARMUS, M. D. (Ed.). v. 2011. n. 10/06/2011. Estados Unidos: National Institutes of Health, 2011b.

PACI, E.; DUFFY, S. W.; GIORGI, D.; ZAPPA, M.; CROCETTI, E.; VEZZOSI, V.; BIANCHI, S.; ROSSELLI DEL TURCO, M. Quantification of the effect of mammographic screening on fatal breast cancers: The Florence Programme 1990-96. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 1, p. 65-69, 2002.

PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B. (Eds.) **Nutrição Básica e Metabolismo**. viçosa: Editora UFV, p.400, 1ª edição ed. 2008.

PIKE, M. C.; KRAILO, M. D.; HENDERSON, B. E.; CASAGRANDE, J. T.; HOEL, D. G. Hormonal risk factors, breast tissue age and the age-incidence of breast cancer. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 767-770, 1983.

PONDER, B. A. J. Cancer genetics. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 336-341, 2001.

PULITI, D.; MICCINESI, G.; COLLINA, N.; DE LISI, V.; FEDERICO, M.; FERRETTI, S.; FINARELLI, A. C.; FOCA, F.; MANGONE, L.; NALDONI, C.; PETRELLA, M.; PONTI, A.; SEGNAN, N.; SIGONA, A.; ZARCONE, M.; ZORZI, M.; ZAPPA, M.; PACI, E. Effectiveness of service screening: a case-control study to assess breast cancer mortality reduction. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 423-427, 2008.

RAPTIS, L.; MENARD, H. A. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Investigation** v. 66, n. 6 p. 1391-1399, 1980.

RISCH, H. A.; MCLAUGHLIN, J. R.; COLE, D. E. C.; ROSEN, B.; BRADLEY, L.; FAN, I.; TANG, J.; LI, S.; ZHANG, S.; SHAW, P. A.; NAROD, S. A. Population BRCA1 and BRCA2 Mutation Frequencies and Cancer Penetrances: A Kin-Cohort Study in Ontario, Canada. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 23, p. 1694-1706, 6 December 2006 2006.

ROSENBERG, L.; BOGGS, D. A.; WISE, L. A.; ADAMS-CAMPBELL, L. L.; PALMER, J. R. Oral Contraceptive Use and Estrogen/Progesterone Receptor-Negative Breast Cancer among African American Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 8, p. 2073-2079, August 1, 2010 2010.

ROSENBERG, L.; ZHANG, Y.; COOGAN, P. F.; STROM, B. L.; PALMER, J. R. A Case-Control Study of Oral Contraceptive Use and Incident Breast Cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 473-479, February 15, 2009 2009.

SAKORAFAS, G. H.; BLANCHARD, K.; SARR, M. G.; FARLEY, D. R. Paget's disease of the breast. **Cancer Treatment Reviews**, v. 27, n. 1, p. 9-18, 2001.

SASTRE-GARAU, X.; JOUVE, M.; ASSELAIN, B.; VINCENT-SALOMON, A.; BEUZÉBOC, P.; DORVAL, T.; DURAND, J. C.; FOURQUET, A.; POUILLART, P. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns **Cancer**, v. 77, n. 1, p. 113-120, 1996.

SAUKKONEN, K.; LAKKISTO, P.; VARPULA, M.; VARPULA, T.; VOIPIO-PULKKI, L. M.; PETTILÄ, V.; PULKKI, K. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. **Intensive Care Medicine**, v. 33 p. 1624-1627, 2007.

SBM; MASTOLOGIA, S. B. D. Recomendações da X Reunião Nacional de Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia. 2008.

SCHWARZENBACH, H.; ALIX-PANABIÈRES, C.; MÜLLER, I.; LETANG, N.; VENDRELL, J.-P.; REBILLARD, X.; PANTEL, K. Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. 1032-1038, February 1, 2009 2009.

SILVA, J. M.; DOMINGUEZ, G.; GARCIA, J. M.; GONZALEZ, R.; VILLANUEVA, M. J.; NAVARRO, F.; PROVENCIO, M.; SAN MARTIN, S.; ESPAÑA, P.; BONILLA, F. Presence of Tumor DNA in Plasma of Breast Cancer Patients. **Cancer Research**, v. 59, n. 13, p. 3251-3256, July 1, 1999 1999.

SKEGG, D.; BERAL, V.; BULL, D.; DOLL, R.; PETO, R.; REEVES, G.; COLDITZ, G.; HULKA, B.; LA VECCHIA, C.; MAGNUSSON, C.; MILLER, T.; PETERSON, B.; PIKE, M.; ROOKUS, M.; THOMAS, D. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58.209 women with breast cancer and 101.986 women without the disease. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1389-1399, 2001.

SKEGG, D.; BERAL, V.; BULL, D.; DOLL, R.; PETO, R.; REEVES, G.; COLDITZ, G.; HULKA, B.; LA VECCHIA, C.; MAGNUSSON, C.; MILLER, T.; PETERSON, B.; PIKE, M.; THOMAS, D.; VAN LEEUWEN, F. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50.302 women with breast cancer and 96.973 women without the disease. **The Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 187-195, 2002.

SORENSEN, G. D.; PRIBISH, D. M.; VALONE, F. H.; MEMOLI, V. A.; BZIK, D. J.; YAO, S. L. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 3, n. 1, p. 67-71, January 1, 1994 1994.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LØNNING, P.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 10860-74, 2001.

SOZZI, G.; CONTE, D.; LEON, M. E.; CIRINCIONE, R.; ROZ, L.; RATCLIFFE, C.; ROZ, E.; CIRENELI, N.; BELLOMI, M.; PELOSI, G.; PIEROTTI, M. A.; PASTORINO, U. Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 21, p. 3902-3908, November 1, 2003 2003.

STEINMAN, C. R. Free DNA in Serum and Plasma from Normal Adults. **The Journal of Clinical Investigation** v. 56, p. 512-515, 1975.

STUEBE, A. The Risks of Not Breastfeeding for Mothers and Infants. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 2 n. 4, p. 222-231, 2009.

STUEBE, A. M.; WILLETT, W. C.; XUE, F.; MICHELS, K. B. Lactation and Incidence of Premenopausal Breast Cancer: A Longitudinal Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 15, p. 1364-1371, August 10, 2009 2009.

STUVER, S. O.; HSIEH, C.-C.; BERTONE, E.; TRICHOPOULOS, D. The association between lactation and breast cancer in an international case-control study: A re-analysis by menopausal status. **International Journal of Cancer**, v. 71, n. 2, p. 166-169, 1997.

SUZUKI, N.; KAMATAKI, A.; YAMAKI, J.; HOMMA, Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 387, n. 1-2, p. 55-58, 2008.

TONG, Y.-K.; LO, Y. M. D. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1-2, p. 187-196, 2006.

TORIO, C. M.; KLASSEN, A. C.; CURRIERO, F. C.; CABALLERO, B.; HELZLSOUER, K. The modifying effect of social class on the relationship between body mass index and breast cancer incidence. . **American Journal of Public Health**, v. 100, n. 1, p. 146-151, 2010.

TUAEVA, N. O.; ABRAMOVA, Z. I.; SOFRONOV, V. V. The Origin of Elevated Levels of Circulating DNA in Blood Plasma of Premature Neonates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1137 p. 27-30 2008.

VAN DEN BRANDT, P. A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S.-S.; ADAMI, H.-O.; BEESON, L.; FOLSOM, A. R.; FRASER, G.; GOLDBOHM, R. A.; GRAHAM, S.; KUSHI, L.; MARSHALL, J. R.; MILLER, A. B.; ROHAN, T.; SMITH-WARNER, S. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; WOLK, A.; HUNTER, D. J. Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 6, p. 514-527, September 15, 2000 2000.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 171-182, 2002.

WHO. GLOBOCAN 2008 (IARC). v. 2011. n. 27/05/2011: World Health Organization, 2008. p.
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#WOMEN/>

ZHONG, X.; LADEWIG, A.; SCHMID, S.; WIGHT, E.; HAHN, S.; HOLZGREVE, W. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 276, n. 4, p. 327-331, 2007a.

ZHONG, X. Y.; HAHN, S.; STEINBORN, A.; HOLZGREVE, W. Quantitative analysis of intact fetal cells in maternal plasma by real-time PCR. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 133, n. 1, p. 20-24, 2007b.

3. Capítulo 2- Fatores de Risco para o Câncer de Mama em Mulheres Atendidas na Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte- MG: um Estudo Caso-Controle

Resumo

Com as modificações no estilo de vida da população, mudanças no padrão reprodutivo da mulher no último século, o perfil de mortalidade entre as mulheres também se modificou, prevalecendo hoje as chamadas doenças crônicas não infecciosas, como as do aparelho cardiovascular e câncer. Entre as mulheres, o câncer de mama figura entre as principais causas de óbito. Medidas como o rastreamento populacional adequado e hábitos de vida saudáveis podem contribuir para a diminuição da incidência dessa patologia. Este trabalho teve como objetivo avaliar os fatores de risco e sua associação com o câncer de mama numa população de mulheres atendidas na Maternidade Odete Valadares, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, em Belo Horizonte, no período de janeiro a julho de 2006. Foram avaliadas e entrevistadas 710 mulheres, dessas foram selecionadas 456, 261 portadoras de Ca de mama e 195 controles saudáveis. Em entrevista com Nutricionistas e estudantes de Nutrição, foram aferidos dados antropométricos (peso, altura, cintura e quadril) e colhidos dados pessoais (escolaridade, idade, procedência). Além disso, elas responderam um questionário sobre aspectos reprodutivos e hábitos de vida (tabagismo, etilismo, prática de atividade física, filhos, idade da menarca e menopausa, uso de contraceptivo oral e terapia de reposição hormonal e amamentação). A associação entre as diversas variáveis independentes e a presença de Ca de mama foi avaliada pelos testes t de Student, Mann-Whitney e qui quadrado de Pearson. Foram estimadas as razões de chances (*odds ratio*) e seus respectivos intervalos de confiança. Este trabalho obteve como resultado a associação positiva entre a inatividade física, menopausa, nuliparidade, ausência de amamentação e história familiar de câncer de mama e o diagnóstico de neoplasia de mama na população estudada. Em mulheres expostas ao álcool no GCO, verificou-se que o álcool teve efeito protetor contra o câncer de mama.

3.1 Introdução

O câncer (Ca) é uma patologia de incidência crescente na população mundial, com projeção de 11,8 milhões de mortes em 2030 (MATHERS *et al.*, 2008). Entre as mulheres, o tipo mais incidente é o de mama, que é a segunda neoplasia mais diagnosticada do mundo, excluindo o Ca de pele não melanoma (PARKIN, 2001). No Brasil, a incidência esperada é de 49.240 casos novos em 2010 e, nos EUA, é de 207.090 e 39.840 óbitos (NCI; INSTITUTE 2011; INCA, 2009). Enquanto a mortalidade é decrescente nos países desenvolvidos, como nos EUA, no Brasil mantém-se estável (DATASUS, 2011).

Apesar do esforço do Ministério da Saúde em desenvolver políticas públicas para rastreamento populacional, no Brasil a incidência é crescente, com alta taxa de mortalidade, fato atribuído ao diagnóstico tardio com retardo no início da terapêutica adequada (INCA e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Esse esforço em ampliar o rastreamento populacional justifica-se pelo relativo bom prognóstico quando o diagnóstico e tratamento são realizados precoce e oportunamente. O programa de rastreamento ainda é falho em detectar alguns casos, apesar de ser planejado para abranger a maioria da população a partir dos 40 anos, idade de inclusão no programa das mulheres com risco habitual, levando em conta o pico de incidência a partir dessa idade (CURADO *et al.*, 2007).

Com a mudança do perfil dos óbitos do século XX, para os dias atuais, com a chamada transição epidemiológica (OMRAN, 2005), observou-se a queda da taxa de mortalidade por doenças infecciosas no início do século XX e a elevação do número de mortes por doenças crônicas não infecciosas, como as doenças cardiovasculares (DCV) e câncer nos dias atuais. Nos EUA, em 1900, as DCV e neoplasias causaram 137 e 64 óbitos/100.000 habitantes, enquanto que, em 1998, estas foram responsáveis por aproximadamente 268 e 200 óbitos/100.000 habitantes. A tuberculose e a diarreia, que eram a segunda e terceira causas de óbito, respectivamente 194 e 142/100.000 habitantes em 1900, no final do século não figuravam entre as 10 principais causas de morte entre a população americana (CDC e PREVENTION, 2000).

Parte dessa mudança poderia ser atribuída ao impacto de medidas de saneamento público, ao desenvolvimento de vacinas e antibióticos, a modificações no estilo de vida da população, com alterações no padrão alimentar, sedentarismo, tabagismo, migração para grandes centros. Um fator importante relacionado ao Ca de mama foi a modificação no perfil de fecundidade da era pré-moderna, quando prevalecia o baixo

estímulo para controle de natalidade, com métodos contraceptivos pouco eficazes (OMRAN, 2005), para o padrão atual com taxa de nascimento em declínio ao longo do século XX, com idade tardia do primeiro filho, menor número de gestações, além do aumento da nuliparidade, contracepção eficaz, uso de contraceptivo hormonal, e terapia de reposição hormonal. Essa redução da fecundidade foi observada com o aumento da expectativa de vida da população. Houve maior intervalo entre os partos, com diminuição da paridade e do reflexo negativo na fecundidade (OMRAN, 2005).

Entre as mulheres, a maior prevalência de câncer é entre as de idade mais avançada, com mais de 75 anos, seguidos por aquelas entre 65-74 anos (CDC *et al.*, 2010). A mortalidade por câncer nos EUA diferiu entre os anos de 1997 e 2007 para cada faixa etária da população. Entre as crianças (até 14 anos), o câncer foi responsável por 12 % dos óbitos, entre 15 e 24 anos, 5 %, de 25 e 44 anos, 14 %, e entre 45 e 64 anos, por 33 % das mortes (CDC *et al.*, 2010).

Vários fatores de risco estão relacionados ao aumento de risco de desenvolver Ca de mama. Hábitos de vida como tabagismo, etilismo e sedentarismo podem influenciar essa taxa de incidência, assim como peso e IMC, que estão diretamente correlacionados com estilo de vida e alimentação, além da procedência e do nível socioeconômico das mulheres. Dentre os fatores de riscos reprodutivos, tem-se a nuliparidade, idade tardia do primeiro filho, menopausa tardia, menarca precoce, ou de hormonioterapia, seja com o intuito de contracepção ou reposição hormonal, serão abordados neste trabalho. A história familiar de Ca de mama (HFCA) e progressão de doença benigna da mama (HPDB) também exercem forte influência.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Casuística

Trata-se de um estudo de caso-controle, de base populacional, com 710 mulheres atendidas no serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares (MOV), Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), em Belo Horizonte, no período de janeiro a julho de 2006.

Esse serviço atende mulheres de Belo Horizonte e do interior do estado de Minas Gerais. Fornece atendimento em várias especialidades, como pediatria, saúde da mulher, ginecologia e obstetrícia, mastologia, dentre outras. Foi fundada em 1955, como casa de parto; foi parte da Santa Casa de Misericórdia e, posteriormente, da Fundação Estadual de Assistência Médica de Urgência – FEAMUR. Em 1977, integrou

a Legião Brasileira de Assistência Social – LBA, passando depois para o INAMPS. Em 1991, passou a integrar a rede FHEMIG. Em 1980, foi transformada em pronto-socorro obstétrico-ginecológico e, em 1986, a MOV tornou-se referência em gestação de alto risco. Foi também referência no tratamento de mulheres portadoras de neoplasia de mama, até a criação do Centro de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), no hospital Alberto Cavalcanti, também da rede FHEMIG.

As pacientes do estudo foram abordadas no serviço de mastologia da MOV após encaminhamento dos postos de saúde, para propedêutica mamária e realização de exames como mamografia e procedimentos cirúrgicos.

O encaminhamento para a realização de mamografia no serviço foi usado como critério de inclusão no estudo. As que possuíam achados suspeitos eram encaminhadas para propedêutico da patologia, como ultrassonografia e biópsia da lesão, e aquelas encaminhadas para cirurgia foram convidadas a participar do estudo. As mulheres que possuíam mamografia, mas sem indicação cirúrgica (receberam outro tipo de atendimento na MOV), também foram convidadas para constituir o grupo controle.

Foram excluídas do estudo aquelas com história pessoal de neoplasia de qualquer sítio, com anatomopatológico indeterminado e com doença benigna da mama.

Foi aplicado um questionário às pacientes que aceitaram participar do estudo a fim de obter dados sobre exposição aos fatores de risco para a neoplasia de mama.

Foram avaliadas inicialmente 710 mulheres; dessas, 236 foram excluídas, sendo seis com passado de neoplasia em outro sítio ou laudo indeterminado e 230 com doença benigna de mama. Das 267 pacientes com neoplasia de mama, seis foram excluídas por falta de anatomopatológico, e, das 207 pacientes sem patologia da mama, 12 foram excluídas por falta de laudo mamográfico (Gráfico 1).

Foram incluídas no estudo 195 mulheres que não possuíam patologia mamária ativa (doença benigna ou maligna), com mamografia de rotina considerada normal (BIRADS 1 ou 2) e 261 mulheres que possuíam mamografia altamente suspeita para malignidade (BIRADS 4 ou 5), encaminhadas para biópsia com confirmação de neoplasia maligna da mama (carcinoma invasivo) e, posteriormente, encaminhadas para cirurgia.

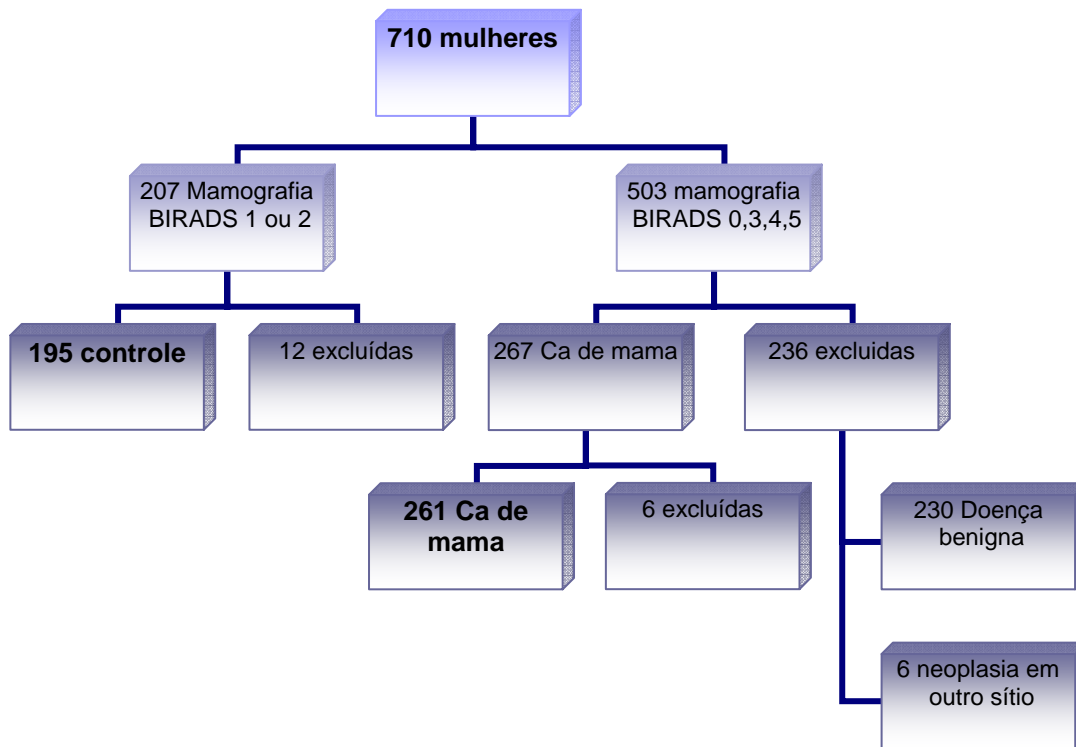


Gráfico 1- Organograma da inclusão de pacientes no estudo

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Rede FHEMIG (Anexo II) e apresentado o Termo de Consentimento Livre e esclarecido a todas as pacientes (Anexo I).

Os critérios de exclusão adotados foram a presença de história pregressa pessoal de câncer (qualquer tipo) e resultado do exame anatomopatológico suspeito ou indeterminado para malignidade.

As pacientes foram então divididas em dois grupos, grupo com câncer de mama (GCA-261 mulheres) e grupo controle (GCO-195 mulheres com ausência de câncer ou doença benigna da mama).

O objetivo do estudo foi avaliar a prevalência dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da neoplasia de mama, e sua correlação com a incidência da doença, a fim de traçar o perfil epidemiológico das mulheres atendidas na MOV.

3.2.2 Abordagem Experimental

As mulheres selecionadas para o estudo foram entrevistadas por nutricionistas e estudantes de nutrição. Foram coletados os dados antropométricos das pacientes atendidas no ambulatório de mastologia da MOV e aplicado questionário para avaliar a exposição aos fatores de risco para o câncer de mama (Anexo III). Foram também

consultados os prontuários das pacientes a fim de obter dados em relação ao anatomopatológico delas.

O questionário foi utilizado para avaliar a associação entre alguns fatores de risco e a presença de Ca de mama.

Em relação à procedência, foi questionado se a cidade de residência das pacientes pertencia ou não à região metropolitana de Belo Horizonte, ou se pertenciam a zona rural.

Quanto à escolaridade, as pacientes foram categorizadas inicialmente como não alfabetizadas (analfabeto à 1ª série do ensino fundamental incompleta); alfabetizada ou alfabetização de adultos; antigo primário incompleto ou 1ª a 3ª série; antigo primário completo ou elementar completo, ou 1ª a 4ª série; ginásio incompleto ou 5ª a 7ª série; ginásio completo ou 5ª a 8ª série; antigo clássico completo ou normal incompleto ou ensino médio incompleto; antigo clássico completo ou normal completo ou ensino médio completo; superior ou mestrado ou doutorado; e posteriormente para análise categorizadas em primário ou elementar completo e incompleto.

Em relação às variáveis relacionadas à vida reprodutiva da mulher e à história prévia de lesão benigna da mama, foi investigada a existência ou não de história de DBM, baseado na memória da paciente, assim como a HPCA. A idade da menarca foi mensurada como a idade em anos da primeira menstruação. A idade da primeira gestação foi considerada a idade em anos em que ocorreu a primeira gravidez completa. Para a variável aleitamento materno, foi considerado o exclusivo quando o leite materno era a única fonte de alimento para o recém-nascido, ou o parcial quando a criança tinha o leite materno concomitante com outros alimentos, de maneira complementar, por um período de pelo menos seis meses. O uso de contraceptivo oral foi considerado nas mulheres que faziam ou fizeram uso de anticoncepcionais e o tempo de uso. Para análise, foi considerado apenas o uso presente ou passado de contraceptivos hormonais. A idade da menopausa foi relatada pelas mulheres como a idade em anos em que ocorreu a ausência de menstruação por um período mínimo de 12 meses anterior à entrevista; e terapia de reposição hormonal, como o uso ou não de hormônio externo no período pós-menopausal.

Em relação aos hábitos de vida, o tabagismo foi avaliado inicialmente pelo hábito de fumar, número de cigarros fumados por dia, e característica do produto e tempo de tabagismo. Foram então codificadas como tabagistas aquelas com hábito de fumar no mínimo um cigarro por dia, e não tabagistas as ex-tabagistas com pelo menos

cinco anos sem fumar e as que nunca fumaram. Como etilismo foi considerada a ingestão de pelo menos uma dose de qualquer bebida alcoólica (10 gramas de álcool) diariamente ou no mínimo por 5 dias por semana. A atividade física foi mensurada pela frequência e tempo gasto na prática de atividade física. Foi utilizado o Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ, versão curta, elaborados pelo Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul (CELAFISCS, 2004; 2007). Foi considerada ativa aquelas que apresentavam atividade vigorosa com frequência superior ou igual há três dias por semana, com duração superior ou igual a 20 minutos por sessão, ou atividade moderada, ou caminhada com frequência superior ou igual a cinco dias por semana, com duração superior ou igual a 30 minutos por sessão, ou qualquer atividade somada (caminhada + moderada + vigorosa) que resultasse numa frequência igual ou superior a cinco dias por semana e tempo gasto superior ou igual a 150 minutos por semana (CELAFISCS, 2004).

Em relação às variáveis antropométricas, o peso foi mensurado usando balança eletrônica TANITA® - *Tanita Body Fat Monitor Scale* (Modelo TBF 531®, *Tanita Corporation of America, Illinois*), com capacidade para 150 kg e sensibilidade de 100g. As mulheres foram pesadas usando menor número de roupas, com um avental de pano, sem sapatos ou acessórios. A estatura foi medida utilizando o estadiômetro vertical *Alturaexata*®, medidas descalças com calcanhares unidos, joelhos juntos e pés formando um ângulo de 45°, em posição ereta. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado utilizando os dados de peso em quilograma (kg) e altura em metros (m), na fórmula P/A^2 . As mulheres foram então classificadas de acordo com o IMC em baixo peso (com IMC menor que 18,5 kg/m²), eutrófica (IMC entre 18,5 e 24,99 kg/m²), sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,99 kg/m²) e obesidade (IMC maior que 30 kg/m²). Posteriormente, elas foram codificadas de acordo com a presença ou ausência de excesso de peso (sobrepeso e obesidade) (WHO, 1995). A relação cintura-quadril foi calculada por meio da relação entre a medida da circunferência da cintura e do quadril em centímetros (cm) (circunferência cintura/circunferência quadril), e categorizadas em maior ou menor que 0,8.

3.2.3 Análise Estatística

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados no Excel. A verificação da distribuição normal das variáveis independentes foi realizada no programa SPSS 17.0, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na análise dos dados, foi feita uma distribuição de frequências das variáveis de interesse. A associação entre as diversas variáveis independentes e a presença de Ca de mama foi avaliada pelos testes t de Student, Mann-Whitney e qui quadrado de Pearson, com nível de significância de 5% para a rejeição da hipótese nula. Foram estimadas as razões de chances (*odds ratio*) e seus respectivos intervalos de confiança. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Epi info 6.04 e SPSS 17.0.

3.3 Resultados

A média de idade das mulheres do GCO foi de 47,82 anos, enquanto a do GCA 54,80 anos. Mais da metade das mulheres de ambos os grupos eram da zona urbana. Nenhuma mulher do GCO possuía história pregressa de doença benigna (HPDB) da mama e apenas duas tinham HFCa de mama, enquanto entre as do GCA, esses valores foram, respectivamente, 51 e 77 mulheres. A média da idade da menarca foi de 13 anos entre os grupos. A média dos meses de amamentação foi maior nas mulheres do GCO em relação às do GCA, mas com valores próximos (11,22 e 10,73 meses, respectivamente). A média de idade da menopausa foi aproximadamente 46,3 anos nos dois grupos. Em relação aos dados antropométricos, o peso e o IMC foram semelhantes nos dois grupos (média de peso de 67,12 e 66,74 kg, média de IMC 27,41 e 27,59, respectivamente no GCO e GCA), e cerca de 80 % das mulheres dos dois grupos possuíam RCQ maior que 0,8 (Tabela 1).

Aproximadamente 19 % das mulheres de ambos os grupos não responderam sobre o consumo de bebida alcoólica, enquanto que, para tabagismo, 13 % das do GCA não responderam.

Tabela 1: Caracterização do perfil demográfico, antropométrico e reprodutivo das pacientes do GCA e GCO

Variáveis	GCO				GCA				p
	Media	DP	Mediana	Mín-máx	Média	DP	Mediana	Mín-máx	
Peso(kg)	67,12	±14,82	65,55	39,80-113,68	66,74	±14,13	64,30	39-116	0,27*
Idade (anos)	47,82	±9,62	47	16-73	54,8	±11,93	53	30-92	<0,001**
Idade da menopausa (anos)	46,36	±5,47	48	28-60	46,38	±5,93	47	28-58	0,95**
Idade da menarca (anos)	13,17	±1,81	13	8-18	13,19	±1,74	13	9-19	0,56**
IMC(kg/m ²)	27,41	±5,54	26,79	16,67-54,78	27,58	±5,64	26,88	16,55-55,26	0,88**
Tempo de amamentação (meses)	11,22	±9,50	8,58	0,44-48	10,73	±10,58	7,25	0-72	0,02**

* t Student **Mann Whitney

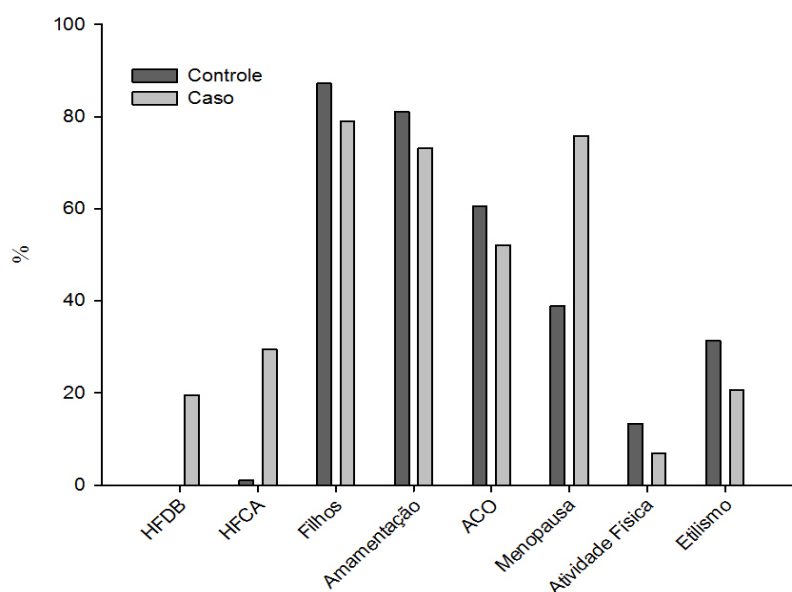


Gráfico 2- Variáveis que apresentaram diferença significativa entre os grupos de portadoras de câncer de mama e de controle.

Tabela 2. Características sociodemográficas e epidemiológicas das pacientes do grupo controle e com Ca de mama

Fator de Risco	Grupo Controle		Grupo Ca de mama		p
	n 195	%	n 261	%	
Zona urbana	111	56,92	139	53,25	0,2323 [#]
Escolaridade (ensino fundamental)	61	31,28	72	27,58	0,1925 [#]
HP Doença benigna	0	0	51	19,54	<0,0000001^{*#}
HFCâncer	2	1	77	29,5	<0,0000001^{*#}
Filhos	170	87,17	206	78,92	0,0109^{*#}
Amamentação	158	81,02	191	73,18	0,01773^{*#}
Contraceção hormonal (ACO)	118	60,51	136	52,10	0,02766^{*#}
Menopausa	76	38,97	75	28,73	<0,0000001^{*#}
Menarca 12 anos	77	39,48	96	36,78	0,2807 [#]
Reposição hormonal	29	14,87	40	15,32	0,4722 [#]
Prática de atividade física	26	13,33	18	6,89	0,009973^{*#}
Excesso de Peso (sobrepeso/obesidade)	126	64,61	175	67,04	0,3243 [#]
RCQ > 0,8	156	80	214	82	0,2504 [#]
Etilismo	61	31,28	54	20,68	0,003^{*#}
Tabagismo	46	23,59	59	22,60	0,3612 [#]

* valores de p=0,05, 95 %.

[#] teste χ^2 de Pearson.

Tabela 3- Associação entre os fatores de risco sociodemográficos e epidemiológicos e o Ca de mama na população estudada

Variável	Odds ratio (OR)	95 % Intervalo de Confiança (CI)
Zona urbana	1,152	0,7879 - 1,685
Escolaridade (ensino fundamental)	1,198	0,7972 - 1,799
HF Câncer	40,64	9,838 - 167,9*
Idade da menarca (media em anos)	0,8927	0,6087 - 1,309
Nuliparidade (filhos)	1,816	1,085 - 3,037*
Ausência de amamentação	1,631	1,031 - 2,578*
Uso de contraceção hormonal	0,6896	0,4713 - 1,009
Menopausa	4,912	3,267 - 7,385*
Menarca 12 anos	0,8927	0,6087 - 1,309
Reposição hormonal	1,019	0,6059 - 1,713
Inatividade física	2,093	1,112 - 3,94*
Excesso de peso (sobrepeso ou obesidade)	1,097	0,7357 - 1,637
RCQ > 0,8	1,191	0,7154 - 1,984
Etilismo	0,5483	0,351 - 0,8564[#]
Tabagismo	1,084	0,6943 - 1,693

*Associação positiva.

[#]Associação protetora.

A idade entre os dois grupos foi diferente, média de 47,82 e 54,80 anos, respectivamente no GCO e GCA (p=0,000). Em relação à procedência, o GCO possuía

maior número de mulheres da zona urbana, mas sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,2323$), e com ensino fundamental incompleto ($p=0,1925$).

Não houve diferença estatística entre os grupos para o peso ($p=0,27$, t student), o IMC ($p=0,886$, Mann Whitney), o excesso de peso ($p=0,3243$, OR 1,097, IC 0,7357 – 1,637, χ^2 Person) e a RCQ ($p=0,2504$, OR 1,191, IC 0,7154- 1,98, χ^2 Person) (Tabelas 1, 2 e 3, Gráfico 3).

Em relação aos fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, a ausência de amamentação mostrou correlação positiva com Ca de mama ($p=0,01$, RR=1,631, IC 1,031-2,578), assim como nuliparidade ($p=0,01$, OR=1,816, IC 1,085-3,037). O tempo de amamentação médio em meses apresentou diferença entre os grupos, maior no GCO ($p=0,025$), mas, para as variáveis idade da menopausa e da menarca, os grupos foram semelhantes entre si ($p=0,949$, $p=0,955$, respectivamente para GCO e GCA). Não houve diferença estatística entre os grupos para as variáveis idade da menopausa e da menarca, mas a presença de menopausa era um fator de risco (OR 4,912, IC 3,267 – 7,385) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 3).

Os dados sobre doença benigna não puderam ser avaliados pela ausência de mulheres no grupo controle com história progressiva dessa patologia, mas, em relação ao HP de Ca de mama, a correlação foi fortemente positiva, com OR 40,64, IC 9,838-167,9.

Os dados encontrados sobre etilismo mostram que o número de mulheres que fazia uso regular de bebida alcoólica foi maior no GCO em relação ao GCA, conferindo assim um efeito protetor contra o câncer. Mais de 19% das mulheres em ambos os grupos não informou sobre exposição a esse fator de risco ($p=0,003$, com OR=0,5483, IC 0,351-0,8564) (Tabela 2 e 3).

Para o tabagismo, houve 34% de perda de resultados no GCA, com dados semelhantes entre os grupos, aproximadamente 23% de tabagismo ($p=0,3612$, OR=1,084, IC 0,6943-1,693)(Tabela 2 e 3).

A avaliação da hormonioterapia oral pré e pós-menopausa, pelo do uso de ACO e TRH, não mostrou correlação com Ca de mama (OR 0,6896, IC 0,4713-1,009, e OR 1,019 e IC 0,6059 - 1,713, respectivamente no GCO e GCA) (Tabelas 2 e 3).

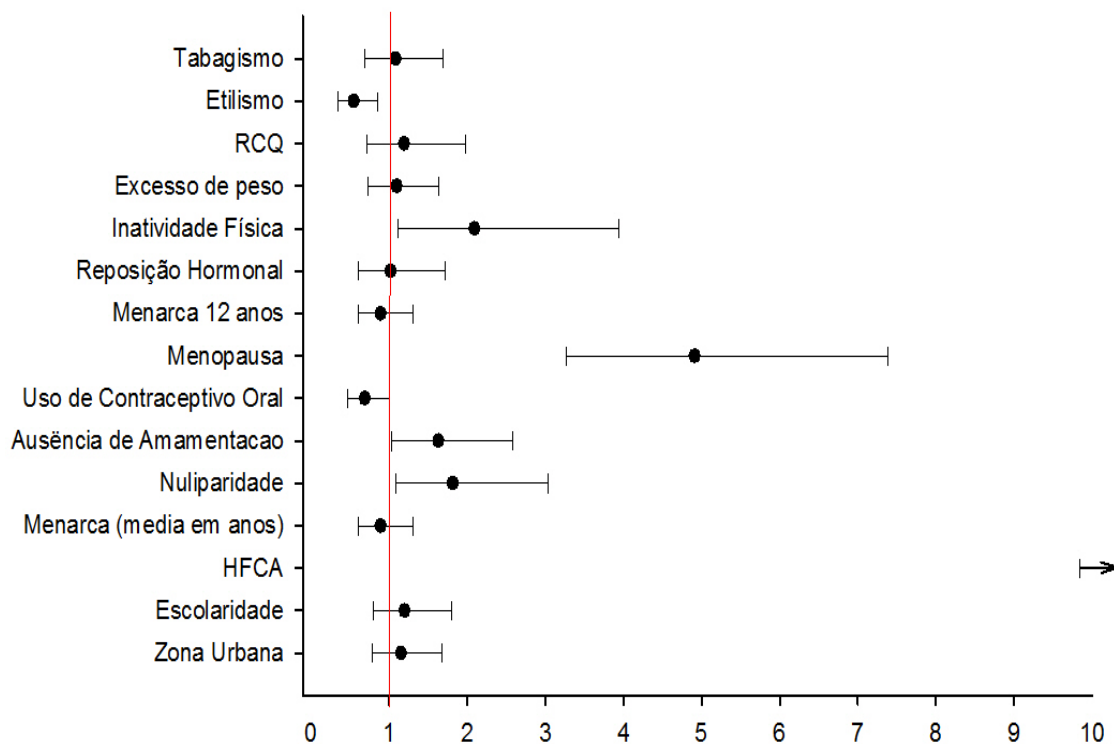


Gráfico 3 – Associação entre as variáveis analisadas e o Ca de mama na população estudada.

3.4 Discussão

Neste trabalho, foram investigados os fatores de risco relacionados aos hábitos de vida, aos aspectos reprodutivos, hormonais e antropométricos de um grupo de mulheres atendidas na MOV, em Belo Horizonte, onde foi avaliada a associação desses achados com o diagnóstico de Ca de mama na população estudada.

Neste estudo, também não foi demonstrada diferença estatística do diagnóstico de Ca de mama em relação à procedência rural ou urbana das mulheres avaliadas ($p=0,2323$, OR 1,152, IC 0,7879 – 1,685), assim como para a variável escolaridade ($p=0,1925$, OR 1,198, IC 0,7972 – 1,799) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 3) à Quanto à procedência, na Croácia, mulheres da zona urbana e rural tiveram a mesma taxa de detecção mamográfica do Ca de mama, apesar da diferença no padrão reprodutivo dos grupos, com mais mulheres da zona urbana nulíparas e com idade tardia do primeiro parto; dois fatores considerados de risco aumentado para essa patologia (STAMENIĆ e STRNAD, 2011). Em New Hampshire, Estados Unidos, o diagnóstico do Ca de mama em estágios mais avançados não parece estar relacionado à distância das mulheres em

relação ao serviço de mamografia ou à procedência rural, e sim à presença ou ausência de seguro saúde, estado civil e idade ao diagnóstico (CELAYA *et al.*, 2010).

A história pregressa de doença benigna (HPDB) e familiar de Ca de mama (HFCA) está relacionada ao aumento do risco de Ca de mama (COLDITZ e ROSNER, 2000; GHIASVAND *et al.*, 2010). A doença benigna associada a esta patologia é aquela que possui características proliferativas, principalmente com atipias celulares, com aumento de até cinco vezes o risco de desenvolver Ca de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Na população estudada, foi avaliada a história pregressa pessoal de doença benigna da mama. Foi encontrada diferença estatística entre os grupos para as duas variáveis. Nenhuma paciente do GCO possuía HPDB enquanto 19,4 % daquelas do GCA possuíam passado de doença benigna, o que impossibilitou o cálculo de OR, apesar dos dados sugerirem comportamento semelhante entre a população estudada e aquelas mulheres que possuem HPDB ($p < 0,0000001$). Em relação à HFCA, apenas duas mulheres do GC possuíam HFCA, ($p < 0,0000001$), com OR 40,64, e IC 9,838 e 167,9 (Tabela 3, Gráfico 3). Esses dados devem ser avaliados cautelosamente, pois, apesar da relevância estatística dos dados, o IC foi muito grande, devido à exposição ter sido muito maior no GCA, e apenas duas pacientes em 195 do CGO expostas. Na literatura é relatado que 12% das pacientes com essa patologia possuem um parente afetado e 1% possui dois ou mais parentes (SKEGG *et al.*, 2002b).

Este trabalho encontrou associações consistentes entre fatores de risco reprodutivos e CA de mama, assim como publicado anteriormente por outros autores (STUEBE, 2009; STUEBE *et al.*, 2009).

Condições fisiológicas que cursem com aumento de exposição hormonal são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de Ca de mama. A prática da amamentação vem crescendo nos últimos anos: de 54,1 % dos bebês americanos amamentados entre 1986-1988, para 73,3 % entre 2002-2004. Esse aumento se deu tanto nas mulheres com idade entre 30 e 44 anos (de 68,6 % para 78,4 %) e menores de 20 anos (28,4 % para 73,2 %) (CDC *et al.*, 2010).

Os dados encontrados mostraram associações positiva entre mulheres que não amamentam e risco aumentado de Ca de mama (OR 1.631, IC 1.031 – 2.578), além de sugerir possível efeito protetor do maior tempo de amamentação ($p=0.025$) (Gráfico 3). Os achados encontrados nesse estudo corroboram com alguns outros dados publicados (STUEBE 2009; STUEBE *et al.* 2009; SKEGG *et al.* 2002), com benefícios da amamentação na população e do tempo de amamentação, diminuindo o risco de Ca de

mama. A ação é atribuída a uma diferenciação das células mamárias durante a gravidez e lactação (KLUTTIG e POKRZYWNIAK, 2009). Esse benefício pode ser atribuído ainda ao período de anovulação em que a mulher se encontra durante o período de amamentação, além da presença de prolactina durante esse processo, com redução dos níveis de estrógeno. Para cada 12 meses de amamentação, é conferido à mulher a redução de risco de 4,3%, e a cada filho 7%. Esse benefício é independente da idade, da menopausa, do número de filhos (SKEGG *et al.*, 2002b). As mulheres que amamentaram tiveram uma redução do risco de Ca de mama pré-menopausal em 25%, e naquelas com história familiar positiva a redução do risco foi ainda maior (STUEBE, 2009; STUEBE *et al.*, 2009).

Em relação ao período de amamentação, os dados ainda são inconsistentes. O mesmo estudo não encontrou associação, enquanto outros estudos sugerem tanto aumento de risco com menor tempo de amamentação quanto benefício em relação ao tempo de amamentação (SKEGG *et al.*, 2002a; GHASVAND *et al.*, 2010). Outros estudos não mostraram associação com a amamentação e com o tempo de amamentação para mulheres pós-menopausadas (STUVER *et al.*, 1997; SKEGG *et al.*, 2002a).

Outro fator reprodutivo que apresentou associação positiva foi a nuliparidade, com OR 1.816 (IC 1.085-3.037). A nuliparidade e a idade tardia do primeiro filho são responsáveis por até 29% dos casos de Ca de mama na população americana (MADIGAN *et al.*, 1995). Mulheres com múltiplas gestações a termo têm um risco diminuído em relação às nulíparas, antes ou após a menopausa (COLDITZ e ROSNER, 2000; RIECK e FIANDER, 2006). Mulheres com idade da primeira gestação a termo aos 35 anos têm incidência maior de Ca de mama quando comparadas às mulheres com idade do primeiro filho menor de 29 anos (COLDITZ e ROSNER, 2000).

A avaliação da idade da menarca e da menopausa não demonstrou diferença estatística entre os grupos ($p=0,955$ e $p=0,949$, respectivamente), pois a idade entre os grupos foi semelhante para a menarca e menopausa, com média em anos de 13,1 e 46,3, respectivamente. Em relação ao número de mulheres em cada grupo, que apresentou menarca com idade inferior a 12 anos, portanto menarca precoce, também não foi encontrada diferença entre os grupos ($p=0,2807$, OR 0,8927, IC 0,6087- 1,309). A menarca precoce e menopausa tardia são condições associadas ao aumento do risco, apesar de ainda existir controvérsia (LACEY JR *et al.*, 2009). Essas duas condições cursam com maior tempo de exposição hormonal, responsável pelo aumento do risco. O benefício da redução de risco pode ser de até 10% para cada dois anos de atraso na

menarca (HSIEH *et al.*, 1990). Dados de ooforectomia com menopausa cirúrgica antes da natural foram associados à proteção para Ca de mama, assim como a queda da incidência de Ca de mama nas mulheres com menopausa aos 45 anos, quando comparadas àquelas aos 55 anos (COLDITZ e ROSNER, 2000). Mulheres que têm um retardo em cinco anos na idade de menopausa apresentam um aumento de risco de 17% (HSIEH *et al.*, 1990). A diferença entre os números de mulheres menopausadas em cada grupo, maior no GCA, foi estatisticamente significativa, com $p < 0,0000001$. A menopausa em si não é considerada fator de risco, mas o envelhecimento natural sim, principalmente após os 50 anos (HOWLADER *et al.*, 2009; HOWLADER N, 2009). Como as mulheres do GCA tinham idade mais elevada, com média de 54,8 anos (DP $\pm 11,93$), essa pode ser a possível explicação para a diferença encontrada (INCA, 2010).

Entre as pacientes do estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no que se refere ao uso de hormônio após a menopausa, ou seja na TRH ($p=0,4722$). O número de mulheres em ambos os grupos que usaram TRH foi semelhante, 14,87 % e 15,32 %, respectivamente no GCO e GCA. Em outros trabalhos, esse fator foi fortemente associado ao aumento de risco (CHEN *et al.*, 2002) em até 23% para aquelas que usaram TRH entre 50 e 60 anos, comparadas com as que não usaram, e principalmente se utilizada a TRH com estrogênio associado à progesterona (COLDITZ e ROSNER, 2000).

Na população iraniana, o uso de contraceptivos orais também foi relacionado ao aumento de risco (GHASVAND *et al.*, 2010). Um maior número de mulheres do GCO usou ACO ($p=0,02766$, OR=0.6896, e IC 0.4713 – 1.009), sugerindo que a diferença entre os grupos pode ter influenciado a presença ou não do diagnóstico, mas de maneira marginal, sem valor significativo. Há descrição na literatura do uso de ACO estar associado ao aumento de risco de Ca de mama em mulheres jovens, questão ainda em análise por não haver dados sólidos na literatura (GHASVAND *et al.*, 2010) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 3).

Entre as pacientes avaliadas, apenas 13,3 e 6,89% das mulheres dos grupos GCO e GCA, respectivamente, relataram frequência regular de atividade física. Essa diferença entre os grupos foi significativa: o sedentarismo responsável por risco elevado para a população inativa fisicamente ($p=0,009973$, OR=2.093, IC 1.112 -3.94) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 3).

Ainda se discute o real impacto da inatividade física e o risco de Ca de mama ou o impacto na mortalidade por essa causa. A redução de risco pode ser explicada pela

ação na redução dos níveis hormonais pelo exercício físico (OGUNLEYE e HOLMES, 2009). A preocupação atual com os possíveis benefícios da prática é observada quando se avalia a prática de atividade física entre a população americana de adultos (>18 anos), com aumento na última década, de 15,1% em 2000 para 18,8% em 2009 (CDC *et al.*, 2010).

Enquanto há relatos de que 10% dos casos de Ca de mama são atribuídos à inatividade física (DANAEI *et al.*, 2005), ainda se postula se o exercício físico reduz o risco de Ca de mama da mesma maneira nas mulheres pré e pós-menopausadas. A redução de risco seria de pelo menos 20% entre mulheres pós-menopausadas, enquanto que nas mulheres pré-menopausadas esse benefício ainda é incerto, sugerindo relação com a quantidade de exercício praticado (MONNINKHOF *et al.*, 2007).

Há descrição de associação entre intensidade do exercício praticado e o impacto na redução de risco, assim como benefícios diferentes dependendo da época de realização do exercício físico, mostrando melhor efeito benéfico para atividade física intensa realizada entre 12 e 22 anos (MARUTI *et al.*, 2008). Mesmo que o impacto seja pequeno em relação à mortalidade pelo Ca de mama, já foi demonstrado benefício na mortalidade por todas as causas em mulheres com diagnóstico de Ca de mama que iniciaram atividade física ou se mantiveram ativas após o diagnóstico (IRWIN *et al.*, 2008; OGUNLEYE e HOLMES, 2009; STERNFELD *et al.*, 2009).

Para as variáveis antropométricas como peso, IMC, excesso de peso e RCQ, não houve diferença estatística entre os grupos. Em ambos, as mulheres possuíam características antropométricas semelhantes, com média de peso de 67,12 e 66,74 kg, IMC médio 27,41(DP±5,54) e 27,59 (DP±5,64) (p=0,886), excesso de peso em 64,61 % e 67,04 % (p=0,3243, OR 1,097, IC 0,7357 – 1,637) respectivamente, no GCO e GCA. Cerca de 80 % das mulheres dos dois grupos possuíam RCQ maior que 0,8 (p= 0,2504, OR 1,191, IC 0,7154- 1,984). Esta última variável ainda não havia sido relacionada ao Ca de mama, mas não foi encontrada correlação positiva na amostra estudada, provavelmente pela homogeneidade dos dados antropométricos entre os grupos (Tabelas 1, 2 e 3, Gráfico 3).

O peso e consequentemente o IMC parecem ter um comportamento distinto em relação ao *status* menopausal. Nas pré-menopausadas, o excesso de peso pode conferir proteção, por estar relacionado a ciclos irregulares, prolongados e mesmo à síndrome dos ovários policísticos, que, além dessas características, apresenta ciclos anovulatórios e com diminuição dos níveis hormonais (KEY e PIKE, 1988; VAN DEN BRANDT *et*

al., 2000), enquanto que na pós-menopausa está claramente relacionado ao aumento de risco (ELIASSEN *et al.*, 2006), por impor a essas mulheres elevação na taxa de estrogênios circulantes por aumento da conversão periférica de estrogênios. Nelas, a relação entre o peso/IMC e Ca de mama é direta, como demonstrou o *Nurses's Health Study* em 2006. O ganho de peso desde os 18 anos está relacionado ao aumento do risco de desenvolver Ca de mama em mulheres pós-menopausa. Quando se compara com aquelas que se mantiveram com peso estável, as que ganharam 10 kg após a menopausa tiveram risco aumentado, e esse aumento foi maior naquelas que não fizeram TRH. As mulheres que emagreceram 10 kg tiveram risco diminuído em comparação com as que mantiveram o peso após a menopausa (ELIASSEN *et al.*, 2006).

Este estudo encontrou um número de mulheres que consumiam regularmente bebida alcoólica menor no GCA, com maior exposição ao fator de risco no GCO, levando aos resultados encontrados ($p=0,003$, OR 0,5483, IC 0,351- 0,8564) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 3). Esses dados são conflitantes com a literatura, em que há correlação positiva com risco de Ca de mama, com até 5 % dos casos atribuídos a esse fator (SCHÜTZE *et al.*, 2011). À luz da literatura atual, não podemos atribuir ao consumo de bebida alcoólica regular efeito protetor como demonstrado, mas apenas sugerir que esses dados foram característicos dessa população estudada, provavelmente de maneira isolada e peculiar, não devendo assim fazer recomendação alguma a esse respeito para nível populacional. Devemos ainda levar em consideração que houve cerca de 20 % de ausência de informações sobre essa variável em ambos os grupos, fator que deve ser levado em conta nessa análise.

Ainda em relação ao etilismo, no Brasil, em 2005, 41,3% relataram consumo de bebida alcoólica nos últimos 12 meses, 40% delas de destilados e 54% de cerveja. O consumo *per capita* de álcool na população como um todo é de cerca de 6 L/ano, e entre as mulheres que relataram consumo de bebida alcoólica, chegava a 10,62 L (WHO, 2011a). Segundo o EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study*), em alguns países europeus, 3 % dos casos de câncer na população feminina são atribuídos ao consumo de álcool pregresso ou atual, maior que o limite superior da normalidade (12g/dia), que variava entre os países de 40 a 98% das mulheres entrevistadas. Na literatura, ainda se atribui em 5% dos casos de Ca de mama no mundo, correlação com consumo de bebida alcoólica (SCHÜTZE *et al.*, 2011).

Para a variável tabagismo, 23,59% e 22,60% das mulheres dos GCO e GCA, respectivamente, fumavam ou fumaram, dados semelhantes entres os grupos, sem

significância estatística ($p=0,3612$, $OR=1,084$, $IC\ 0,6943 - 1,693$). Houve 13% de ausência de resposta no GCA, o que pode explicar a ausência de diferença entre os grupos.

A prevalência do tabagismo entre as mulheres na América é de cerca de 12% (WHO, 2011b) e, no Brasil, em 2008, de 12,4% (WHO, 2009), com declínio do hábito na última década (MONTEIRO *et al.*, 2007). Nos EUA, foi observado fenômeno semelhante, enquanto, em 2000, 23 % das pessoas com 18 anos ou mais fumavam. Em 2009, esse número caiu para 20,6 % (CDC *et al.*, 2010).

Ao contrário de outros tumores, como pulmão, pâncreas, fígado, orofaringe e esôfago, em que há forte correlação com o hábito de fumar (DANAIEI *et al.*, 2005), ainda é controversa a associação entre o tabagismo e a neoplasia de mama, apesar de haver dados na literatura que relacionam uma elevação no risco com início precoce do tabagismo e longa duração do hábito (CUI *et al.*, 2006), além de um risco aumentado naquelas pacientes com história de tabagismo atual, em relação às ex-tabagistas, com aumento de risco persistente por cerca de 20 anos, após interrupção do hábito, e risco aumentado mesmo nas mulheres com história de tabagismo passivo (LUO *et al.*, 2011).

3.5 Conclusão

Foram encontradas associações positivas para as variáveis inatividade física, menopausa, nuliparidade, ausência de amamentação e história familiar de Ca de mama. Nenhuma paciente do GCO possuía HF de doença benigna da mama, impossibilitando sua análise de associação de risco. A associação entre HFCA e Ca de mama foi fortemente positiva (IC muito grande para a variável), possivelmente por haver um número expressivo de mulheres com esse fator de risco no GCA em relação ao GCO (77 e 2, respectivamente), devendo esse dado ser analisado com cautela. Além disso, foi encontrada uma associação espúria entre o maior número de mulheres com história de etilismo no GCO e a redução de risco para GCA. Devem ser levados em conta, para a análise crítica dos dados, 19 % de abstenção de resposta para este item em ambos os grupos, o que poderia mascarar os resultados de uma possível associação entre etilismo e Ca de mama, responsável pelos dados divergentes encontrados na literatura.

3.6. Referências Bibliográficas

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2009.

CDC; PREVENTION, C. F. D. C. A. Leading Causes of Death, 1900-1998. v. 2011. n. 15/06/20112000. p. http://www.cdc.gov/nchs/data/dvs/lead1900_98.pdf
<http://wonder.cdc.gov/wonder/help/cmhf.html#Compressed> Mortality File: Archives of Previous Releases.

CDC; PREVENTION, C. F. D. C. A.; HEALTHSTATISTICS, N. C. F.; SERVICES, U. D. O. H. A. H. *HEALTH, UNITED STATES, 2010*. United States: CDC, 2010.

CELAFISCS. Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul. v. 2007. n. 15 de janeiro de 2007. São Caetano do Sul2004. p. Disponível em <
Error! Hyperlink reference not valid.

CELAFISCS. Questionário Internacional de Atividade Física - versão curta. v. 2011, n. 12/06/2011, p. www.celafiscs.com.br, 2007.

CELAYA, M. O.; BERKE, E. M.; ONEGA, T. L.; BL RIDDLE, B. L.; CHERALA, S. S.; J.R., R. Breast cancer stage at diagnosis and geographic access to mammography screening (New Hampshire, 1998-2004). *Rural and Remote Health (Online)*, v. 10, p.1361, 2010.

CHEN, C. L.; WEISS, N. S.; NEWCOMB, P.; BARLOW, W.; WHITE, E. Hormone Replacement Therapy in Relation to Breast Cancer. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 6, p. 734-741, February 13, 2002 2002.

COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. Cumulative Risk of Breast Cancer to Age 70 Years According to Risk Factor Status: Data from the Nurses' Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 10, p. 950-964, November 15, 2000 2000.

CUI, Y.; MILLER, A. B.; ROHAN, T. E. Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. **Breast Cancer Research Treatment** v. 100 p. 293-299, 2006.

CURADO, M. P.; EDWARDS, B.; SHIN, H. R.; STORM, H.; FERLAY, J.; HEANUE, M.; BOYLE, P. (Eds.) **Cancer Incidence in Five Continents** France: International Agency for Research on Cancer(IARC) Scientific Publications, v.IXed. 2007.

DANAEI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784-1793, 2005.

ELIASSEN, A. H.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; WILLET, W. C.; HANKINSON, S. E. Adult Weight Change and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 2, p. 193-201, July 12, 2006 2006.

GHIASVAND, R.; MARAM, E. S.; TAHMASEBI, S.; TABATABAEE, S. H. R. Risk factors for breast cancer among young women in southern Iran. **International Journal of Cancer**, p. n/a-n/a, 2010.

HOWLADER N, N. A., KRAPCHO M, NEYMAN N, AMINOU R, WALDRON W, ALTEKRUSE SF, KOSARY CL, RUHL J, TATALOVICH Z, CHO H, MARIOTTO A, EISNER MP, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, CRONIN KA, EDWARDS BK (EDS). . SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. In: BETHESDA, M. (Ed.). v. 2011. n. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011: National Cancer Institute, 2009.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M. P.; LEWIS, D. R.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; CRONIN, K. A.; EDWARDS, B. K. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. In: BETHESDA, M. (Ed.). v. 2011. n. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011: National Cancer Institute, 2009.

HSIEH, C.-C.; TRICHOPOULOS, D.; KATSOUYANNI, K.; YUASA, S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: Associations and interactions in an international case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 5, p. 796-800, 1990.

INCA. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. 2009.

INCA. Cancer no Brasil/ Dados do Registro de Base Populacional,. v. 2011. n. 13/06/20112010. p. <http://www1.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/>.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 50, n. 2 p. 77-90, 2004.

IRWIN, M. L.; SMITH, A. W.; MCTIERNAN, A.; BALLARD-BARBASH, R.; CRONIN, K.; GILLILAND, F. D.; BAUMGARTNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BERNSTEIN, L. Influence of Pre- and Postdiagnosis Physical Activity on Mortality in Breast Cancer Survivors: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 26, n. 24, p. 3958-3964, August 20, 2008 2008.

KEY, T. J. A.; PIKE, M. C. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 29-43, 1988.

KLUTTIG, A.; POKRZYWNIAK, A. S. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. **Breast Care**, v. 4 p. 82-87, 2009.

LACEY JR, J. V.; KREIMER, A. R.; BUYS, S. S.; MARCUS, P. M.; CHANG, S. C.; LEITZMANN, M. F.; HOOVER, R. N.; PROROK, P. C.; BERG, C. D.; HARTGE, P. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the

Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9 p. 84, 2009.

LUO, J.; MARGOLIS, K. L.; WACTAWSKI-WENDE, J.; HORN, K.; MESSINA, C.; STEFANICK, M. L.; TINDLE, H. A.; TONG, E.; ROHAN, T. E. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 342, January 1, 2011 2011.

MADIGAN, M. P.; ZIEGLER, R. G.; BENICHO, J.; BYRNE, C.; HOOVER, R. N. Proportion of Breast Cancer Cases in the United States Explained by Well-Established Risk Factors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 22, p. 1681-1685, November 15, 1995 1995.

MARUTI, S. S.; WILLETT, W. C.; FESKANICH, D.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. A. A Prospective Study of Age-Specific Physical Activity and Premenopausal Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 10, p. 728-737, May 21, 2008 2008.

MATHERS, C.; BOERMA, T.; FAT, D. M. (Eds.) **THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE 2004 UPDATE**. Switzerland: World Health Organizationed. 2008.

MONNINKHOF, E.; ELIAS, S.; VLEMS, F.; VAN, D.; SCHUIT, A.; VOSKUIL, D.; VAN LEEUWEN, F. Physical activity and breast cancer: a systematic review. **Epidemiology**, v. 18, p. 137 - 157, 2007.

MONTEIRO, C. A.; CAVALCANTE, T. M.; MOURA, E. C.; CLARO, R. M.; SZWARCOWALD, C. L. Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989-2003). **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, p. 527-534, 2007.

OGUNLEYE, A.; HOLMES, M. Physical activity and breast cancer survival. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 106, 2009.

OMRAN, A. R. The Epidemiologic Transition:A Theory of the Epidemiology of Population Change. **The Milbank Quarterly-(Reprinted from The Milbank Memorial Fund Quarterly, Vol. 49, No. 4, Pt. 1, 1971 (pp. 509–38))**, v. 83, n. 4, p. 731-57, 2005.

PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001.

RIECK, G.; FIANDER, A. The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 20, n. 2, p. 227-251, 2006.

SCHÜTZE, M.; BOEING, H. R.; PISCHON, T.; REHM, J.; KEHOE, T.; GMEL, G.; OLSEN, A.; TJØNNELAND, A. M.; DAHM, C. C.; OVERVAD, K.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; TRICHOPOULOU, A.; BENETOU, V.; ZYLIS, D.; KAAKS, R.; ROHRMANN, S.; PALLI, D.; BERRINO, F.; TUMINO,

R.; VINEIS, P.; RODRÍGUEZ, L.; AGUDO, A.; SÁNCHEZ, M. J.; DORRONSORO, M.; CHIRLAQUE, M. D.; BARRICARTE, A.; PEETERS, P. H.; VAN GILS, C. H.; KHAW, K. T.; WAREHAM, N.; ALLEN, N. E.; KEY, T. J.; BOFFETTA, P.; SLIMANI, N.; JENAB, M.; ROMAGUERA, D.; WARK, P. A.; RIBOLI, E.; BERGMANN, M. M. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 342, p. 1584 January 1, 2011 2011.

SKEGG, D.; BERAL, V.; BULL, D.; DOLL, R.; PETO, R.; REEVES, G.; COLDITZ, G.; HULKA, B.; LA VECCHIA, C.; MAGNUSSON, C.; MILLER, T.; PETERSON, B.; PIKE, M.; THOMAS, D.; VAN LEEUWEN, F.; CANCER, C. G. O. H. F. I. B. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50.302 women with breast cancer and 96.973 women without the disease. **The Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 187-195, 2002a.

SKEGG, D.; BERAL, V.; BULL, D.; DOLL, R.; PETO, R.; REEVES, G.; COLDITZ, G.; HULKA, B.; LA VECCHIA, C.; MAGNUSSON, C.; MILLER, T.; PETERSON, B.; PIKE, M.; THOMAS, D.; VAN LEEUWEN, F. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50.302 women with breast cancer and 96.973 women without the disease. **The Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 187-195, 2002b.

STAMENIĆ, V.; STRNAD, M. Urban-rural differences in a population-based breast cancer screening program in Croatia. **Croatian Medical Journal**, v. 52 p. 76-86, 2011.

STERNFELD, B.; WELTZIEN, E.; QUESENBERRY, C. P.; CASTILLO, A. L.; KWAN, M.; SLATTERY, M. L.; CAAN, B. J. Physical Activity and Risk of Recurrence and Mortality in Breast Cancer Survivors: Findings from the LACE Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 1, p. 87-95, January 1, 2009 2009.

STUEBE, A. The Risks of Not Breastfeeding for Mothers and Infants. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 2 n. 4, p. 222-231, 2009.

STUEBE, A. M.; WILLETT, W. C.; XUE, F.; MICHELS, K. B. Lactation and Incidence of Premenopausal Breast Cancer: A Longitudinal Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 15, p. 1364-1371, August 10, 2009 2009.

STUVER, S. O.; HSIEH, C.-C.; BERTONE, E.; TRICHOPOULOS, D. The association between lactation and breast cancer in an international case-control study: A re-analysis by menopausal status. **International Journal of Cancer**, v. 71, n. 2, p. 166-169, 1997.

VAN DEN BRANDT, P. A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S.-S.; ADAMI, H.-O.; BEESON, L.; FOLSOM, A. R.; FRASER, G.; GOLDBOHM, R. A.; GRAHAM, S.; KUSHI, L.; MARSHALL, J. R.; MILLER, A. B.; ROHAN, T.; SMITH-WARNER, S. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; WOLK, A.; HUNTER, D. J. Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 6, p. 514-527, September 15, 2000 2000.

WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. v. 2011. n. 12/06/2011. Geneva: World Health Organization, 1995.

WHO. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments v. Appendix V: Country profiles: World Health Organization, 2009. p. http://www.who.int/tobacco/mpower/2009/Appendix_V-table_1.pdf.

WHO. *Global status report on alcohol and health 2011* World Health Organization, 2011a. Acesso em: 19/06/2011.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. *Chapter 1-Burden: mortality, morbidity and risk factors*: World Health Organization, 2011b. p. 176.

4. Capítulo 3 - Determinação da Fração Livre de DNA Plasmático em Pacientes Portadoras de Câncer de Mama: Comparação entre os Genes GAPDH e β -actina

Resumo

O câncer de mama é uma importante causa de morbimortalidade entre as mulheres em todo o mundo. Enquanto nos países desenvolvidos o aumento da incidência é acompanhado da diminuição da mortalidade por essa causa, em países em desenvolvimento, como o Brasil, a incidência elevada ainda é acompanhada de mortalidade crescente. Ainda hoje o principal método de rastreamento mundialmente utilizado é o exame clínico das mamas e a mamografia. A descoberta de frações livres de DNA em sangue periférico e sua correlação com diversas patologias, dentre elas o Ca de mama, trouxe a possibilidade de sua utilização como método diagnóstico em mulheres portadoras dessa patologia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de dois marcadores, os genes que codificam respectivamente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -actina, para a quantificação de FLDNA plasmático em portadoras de Ca de mama e controles saudáveis, a fim de comparar a capacidade diagnóstica do método e identificar qual o melhor marcador para identificar as pacientes portadoras de neoplasia de mama. Foram avaliadas 50 mulheres, 30 casos e 20 controles saudáveis, e realizada dosagem de FLDNA plasmático utilizando PCR em tempo real. Os resultados obtidos mostraram que tanto a β -actina como o GAPDH ampliaram FLDNA plasmático em mulheres portadoras de Ca de mama e controles, mas a β -actina identificou com maior acurácia as portadoras de Ca de mama. A dosagem de FLDNA utilizando a β -actina foi o melhor marcador para a identificação das pacientes portadoras de neoplasia de mama, quando comparadas às do grupo controle saudáveis.

4.1 Introdução

O câncer é uma das principais causas de morte em ambos os sexos, principalmente em países desenvolvidos. Em 2008, a IARC/OMS estimou 12,4 milhões de casos novos de câncer e cerca de 7,6 milhões de óbitos no mundo (BOYLE e LEVIN, 2008). A taxa de incidência aumentou e a de mortalidade diminuiu em países desenvolvidos, enquanto que no Brasil a mortalidade ficou estável nas últimas décadas (INCA e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; DATASUS, 2011).

O câncer de mama, excluindo o de pele não melanoma, é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido ao aumento da expectativa de vida, urbanização crescente e adoção de estilo de vida ocidental. No Brasil, o número de casos projetado para o biênio 2010-2011 é de aproximadamente de 49.240 mulheres, representando um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2009).

O prognóstico dessa patologia tem relação direta com a precocidade do diagnóstico (CURADO *et al.*, 2007). Para isso utilizam-se métodos de rastreamento populacional como a mamografia. Apesar da redução da mortalidade com o rastreamento, um número significativo de mulheres ainda não são diagnosticadas oportunamente.

Métodos não invasivos de detecção precoce do câncer de mama têm sido amplamente almejados por especialistas, pela facilidade de execução e possibilidade de utilização em larga escala na população, a fim de produzirem impacto positivo no diagnóstico precoce e na redução na taxa de mortalidade.

A elevação da fração livre de DNA correlacionou-se com o diagnóstico de várias neoplasias (LEON *et al.*, 1977; TONG *et al.*, 2003; GANG *et al.*, 2010; SCHWARZENBACH *et al.*, 2011). Essa correlação também foi descrita em patologias como lúpus, pré-eclâmpsia e pacientes internados em unidade de terapia intensiva com disfunção de múltiplos órgãos (RAPTIS e MENARD, 1980; SAUKKONEN *et al.*, 2007; LAZAR *et al.*, 2009).

A quantificação da fração livre do DNA tumoral pode ser mensurada a partir da pesquisa de alterações genéticas e mutações presentes no DNA tumoral dessas frações (POLYAK *et al.*, 1998; TAN *et al.*, 2002; HIYAMA *et al.*, 2003; DIEHL *et al.*, 2008).

A primeira descrição da presença de fragmentos de DNA no plasma foi em 1948 (MANDEL e METAIS, 1948). Apenas em 1977 foram novamente descritos no soro de paciente com câncer e em controles, correlacionando os níveis mais elevados com a

presença de metástases e a queda dos níveis após radioterapia, com correlação prognóstica. Neste estudo, em 50 % dos pacientes com tumores encontraram-se níveis considerados “normais”, não sendo, portanto, de grande valor diagnóstico (LEON *et al.*, 1977). A detecção da fração livre do DNA foi amplamente utilizada na última década para tentar correlacionar estados patológicos ou fisiológicos com os níveis desses fragmentos no sangue (LO, 2000; TONG *et al.*, 2003; SWARUP e RAJESWARI, 2007; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010). Na área da ginecologia e obstetrícia, a dosagem de FLDNA fetal no sangue materno foi correlacionada como desenvolvimento de pré-eclâmpsia (SAUKKONEN *et al.*, 2007; LAZAR *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual fragmentos livres de DNA chegam à circulação sanguínea ainda não está claro. As hipóteses mais prováveis são a necrose celular (esta com padrão de fragmentos irregulares) ou apoptose. Na necrose celular, a célula lesada cursa com ruptura de sua membrana e libera todo seu conteúdo no meio extracelular, enquanto que, na apoptose, conhecida como a morte celular programada, a célula deflagra uma sequência de reações por ações enzimáticas (caspases), levando a cascata proteolítica, que culmina com a desestruturação do citoesqueleto, o desmonte do envelope nuclear e a fragmentação do DNA. A célula é então fagocitada por macrófagos (ALBERTS *et al.*, 2007).

Ao analisar os fragmentos de DNA livres em pacientes portadores de neoplasia de pâncreas e nos controles, ambos mostraram padrões autorradiográficos formando escada, com três a cinco vezes o comprimento de nucleossomos (associado à lesão/quebra do DNA entre os nucleossomos), o que não ocorre na necrose tecidual, cuja fragmentação é casual, formando fragmentos de tamanhos variados (GIACONA *et al.*, 1998).

A presença de lesão tanto tissular como celular é uma condição encontrada fisiologicamente em tecidos normais e em patologias. Espera-se então encontrar fragmentos desse material intracelular, incluindo DNA no ambiente extracelular, como de fato foi descrito por muitos autores em patologias diversas (DAVIS e DAVIS IV, 1973; LEON *et al.*, 1977; LO, 2000; JYLHÄVÄ *et al.*, 2010), e algumas vezes correlacionando-se com a gravidade do estado patológico (SAUKKONEN *et al.*, 2007). Ainda não foi estabelecido um valor considerado padrão da normalidade para os controles normais, e eles variam mesmo entre os controles saudáveis, entre os estudos.

Apesar do significado clínico das frações livres de DNA ainda não serem conclusivos, os estudos sugerem que esse pode ser, num futuro próximo, um método de diagnóstico e acompanhamento de resposta clínica não invasivo (HUANG *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de dois marcadores, o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e da β -actina, nas mesmas amostras para a quantificação das FLDNA em pacientes com neoplasia de mama e controles saudáveis, a fim de comparar os valores encontrados e avaliar qual o melhor marcador para a detecção de neoplasia de mama nos indivíduos.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Casuística

Trata-se de um estudo de caso-controle, de base populacional, mulheres atendidas no serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares (MOV), Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de janeiro a julho de 2006. A MOV atendia as mulheres de Belo Horizonte e região, encaminhadas pelos postos de saúde para propedêutica mamária, como a realização de exames de mamografia e procedimentos cirúrgicos diagnósticos e terapêuticos.

Essas pacientes foram encaminhadas para realização de mamografia, utilizada como critério de inclusão no estudo. Foram avaliadas 710 mulheres inicialmente, as que aceitaram participar do estudo, entrevistadas, e 50 delas foram selecionadas para a dosagem de FLDNA, 20 pacientes sem patologia mamária ativa (doença benigna ou maligna), com mamografia de rotina considerada normal (BIRADS 1 ou 2), e 30 com mamografia altamente suspeita para malignidade (BIRADS 4 ou 5). As pacientes, cuja mamografia sugeria processo maligno ou altamente suspeito, foram encaminhadas para biópsia e confirmação de neoplasia maligna da mama (carcinoma invasivo), e, posteriormente, encaminhadas para cirurgia (Gráfico 1).

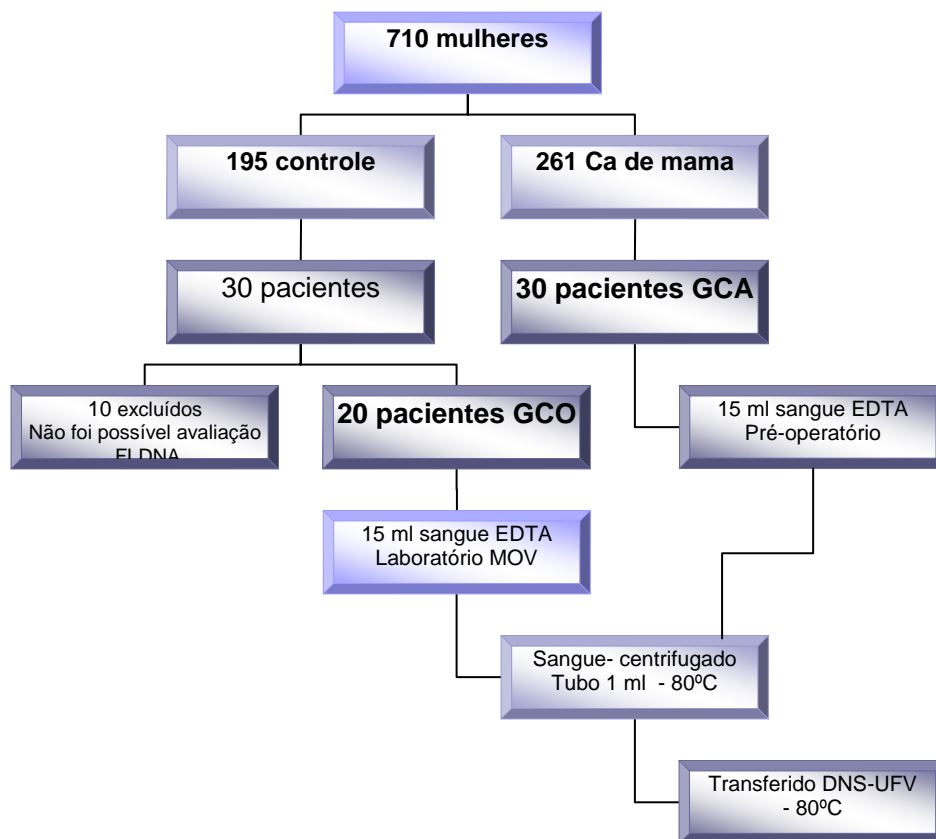


Gráfico 1: Organograma do estudo.

As pacientes foram alocadas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de patologia mamária maligna, grupo com câncer de mama (GCA-30 mulheres) e grupo controle (20 mulheres GCO- ausência de câncer ou doença benigna da mama).

Este estudo teve aprovação do comitê de ética da Rede FHEMIG (Anexo II) em Belo Horizonte, e a todas as participantes foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (Anexo I). Como critérios de exclusão foram adotados a presença de história pregressa pessoal de câncer de qualquer etiologia e o resultado do exame anatomopatológico suspeito ou indeterminado para malignidade.

4.2.2 Abordagem Experimental

Foram coletados 15 ml de sangue em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de cada paciente. Naquelas do GCA, o sangue foi coletado após um período de jejum pré-operatório, antes da anestesia para a realização do procedimento cirúrgico, enquanto que nas do GCO foram realizadas no laboratório do banco de sangue da maternidade.

O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma, separado em tubo de 1 mL e armazenado a -80 °C. Esse material foi então transferido para o Departamento de Nutrição e Saúde, Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal de Viçosa, e mantido a -80 °C até o momento da análise (Gráfico 1).

Para a extração do DNA, foi utilizado o *High pure PCR Template Preparation Kit*[®] (Diagnostics Roche, Alemanha). Foram utilizados 200 µL de plasma para a extração de DNA conforme o protocolo do fabricante.

Para a quantificação da fração livre do DNA, foram utilizados os gene que codificam a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (SIGMA[®] Life Science) e β-actina (BIONEER) (Tabela 1). As amostras foram analisadas em duplicata, usando o aparelho *Step one PlusTM Real Time PCR System Thermal Cycling Block*, da *Applied Biosystems*.

A reação de amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- Desnaturação inicial - 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C.

Para a reação com o GAPDH, foram utilizados 25 µl de reação total (12,5 µl MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1 µl DNA, 7,5 µl água, 10 pmol dos *primers*). Para a reação com β-actina, foram utilizados também 25 µl de reação total (12,5 µl MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1 µl DNA, 1,5 µl água e 10 pmol dos *primers*).

Para o cálculo da quantidade de FLDNA, foi utilizada a equação

$C = Q \times V_{dna} / V_{pcr} \times 1 / V_{ext}$ (C concentração DNA no plasma em cópias por mililitro, Q cópias do genoma, V_{dna} volume total da extração (10 µl); V_{pcr} , volume da solução de DNA usado na reação de PCR (1 µl); V_{ext} , volume de plasma extraído. A concentração em nanogramas por mililitro foi calculada usando o fator de conversão 6.6 pg DNA por célula (equivalente genômico) (GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006).

Tabela 1- Sequência dos *primers* utilizados para a quantificação das FLDNA

GENE	Sequência	Tamanho
GAPDH	foward 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'	494 pb
	reverse 5'-GATGGGATTTCCATTGATGACA-3'	
β-actina	foward 5'-ATGTTTGAGACCTTCAACAC-3'	70 pb
	reverse 5'-CACGTCAGACTTCATGATGG-3'	

4.2.3 Análise Estatística

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados no Excel. A verificação da distribuição normal das variáveis independentes foi realizada no programa SPSS 17.0, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na análise dos dados, foi feita uma distribuição de frequências das variáveis de interesse. A associação entre as diversas variáveis independentes e a presença de Ca de mama foi avaliada pelos testes t de Student, Mann-Whitney e qui quadrado de Pearson, com nível de significância de 5 % para a rejeição da hipótese nula. Foram estimadas as razões de chances (*odds ratio*) e seus respectivos intervalos de confiança. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas **Epi info** 6.04 e SPSS 17.0.

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização da População

As pacientes do GCA tinham idade média de 53,4 anos (DP \pm 12,06), e as do GCO 47,75 anos (DP \pm 8,39), e possuíam características antropométricas semelhantes. A maioria apresentava sobrepeso ou obesidade (55 % e 56,6 % GCO e GCA, respectivamente), média de peso de 64,17 kg (DP \pm 14,40) e 65,93 kg (DP \pm 13,50) ($p=0,663$) e IMC de 26,26 (DP \pm 4,80) e 26,98 (DP \pm 4,75) ($p=0,60$) no GCO e GCA, respectivamente (Tabela 2).

Mais mulheres no GCO apresentavam RCQ maior que 0,8 em relação ao GCA, 95% e 73,3% respectivamente, com diferença significativa estatisticamente entre os grupos ($p=0,044$) (Tabela 3).

Em relação aos fatores de risco reprodutivos, maior número de mulheres do grupo Ca de mama usou contraceptivo oral (GCA=63,3% e GCO 45%, $p=0,14$), estavam na menopausa (GCA=6,6 e GCO=35 %, $p=0,0001$), usaram terapia de reposição hormonal (TRH) (GCA=20% e GCO=10%, $p=0,21$) (Tabelas 3 e 4).

Mais mulheres do grupo controle amamentaram (GCO=80% e GCA=77%, $p=0,43$), mas com tempo de amamentação médio por filho menor (GCO=8,78 e GCA=10,73 meses, $p=0,8$). Em relação à prole, a quantidade de nulíparas foi semelhante nos dois grupos (20%, $p=0,49$), assim como para a média de idade da menarca (GCO 12,6 e GCA 13 anos, $p=0,58$) (Tabelas 2, 3 e 4).

Já o grupo controle apresentava idade mais jovem (47,7 x 53,4 anos, $p=0,075$), não apresentava história progressiva de doença benigna (GCO=0 e GCA=20 %, $p=0,01$)

ou maligna da mama (GCO=0 e GCA=46 %, p=0,00008), apresentava maior número de praticantes de atividade física em relação ao GCA (CGO=20% e GCA=10%, p=0,23), considerados fatores de proteção (COLDITZ e ROSNER, 2000; IRWIN *et al.*, 2008) (Tabelas 2 e 3, Gráfico 2).

Em relação à escolaridade, o número de mulheres com ensino fundamental completo era menor no GCO (GCO=60 % e GCA=63,4 %, p=0,40) assim como a procedência da zona urbana (GCO=50 % e GCA=60 %, p=0,63), dois fatores de risco que não podem ser analisados independentemente, mas que refletem mudanças no padrão reprodutivo, como paridade, número de filhos, amamentação, realização de mamografia, dentre outros; com risco aumentado nas mulheres da zona urbana e de maior nível socioeconômico (STAMENIĆ e STRNAD, 2011) (Tabela 3, Gráfico 2).

As variáveis etilismo e tabagismo, em ambos, tiveram um número representativo de mulheres cujos dados não foram informados (etilismo, GCO=40 % e GCA=3.3 %, e tabagismo GCA=13 %), devendo esses dados ser analisados cautelosamente (Tabelas 2 e 3).

Para as variáveis HPDB e HFCA, não foi possível a avaliação da associação de risco por não haver pacientes no grupo controle com esse fator de risco (Tabela 3 e Gráfico 2).

Tabela 2: Caracterização do perfil sociodemográfico, antropométrico e reprodutivo das pacientes do GCO e GCA

Variáveis	GCO n=20		GCA n=30		p
	Média	DP	Média	DP	
Peso (kg)	64,17	±14,40	65,93	±13,50	0,66*
Idade (anos)	47,75	±8,39	53,40	±12,06	0,075*
Idade da menopausa (anos)	47,14	±5,04	45,62	±6,87	0,58*
Idade da menarca (anos)	12,6	±1,60	13,00	±1,70	0,40*
IMC(kg/m ²)	26,26	±4,80	26,98	±4,75	0,60*

* t Student

Tabela 3: Caracterização sociodemográfica, antropométrica e reprodutiva das pacientes do GCO e GCA das participantes do estudo

Fator de Risco	Grupo Controle		Grupo mama		p
	n 20	%	n 30	%	
Zona Urbana	10	50	18	60	0,63 [#]
Escolaridade (ensino fundamental)	12	60	19	63,4	0,40 [#]
HP Doença benigna	0	0	6	20	0,01 ^{**#}
HFCâncer	0	0	14	46,6	0,00008 ^{**#}
Filhos	16	80	24	80	0,49 [#]
Amamentação (ausência)	5	20	7	23	0,43 [#]
Uso de Contracepção hormonal	9	45	19	63,3	0,14 [#]
Menopausa	7	35	26	86,6	0,0001 ^{**#}
Menarca <12 anos	11	55	9	30	0,045 ^{**#}
Reposição hormonal	2	10	6	20	0,21 [#]
Prática de atividade física	4	20	4	13,33	0,23 [#]
Excesso de peso (sobrepeso/obesidade)	11	55	17	56,6	0,40 [#]
RCQ > 0,8	19	95	22	73,3	0,044 ^{**#}
Etilismo	6	30	8	26,6	0,20 [#]
Tabagismo	3	15	6	20	0,31 [#]

* p<0,05, # Qui quadrado.

Tabela 4: Associação entre os fatores de risco e o câncer de mama na população estudada

Variável	Odds ratio (OR)	95 % IC
Zona Urbana	1,62	0,49 - 5,30
Escolaridade (ensino fundamental)	1,152	0,36 - 3,68
Menarca (<12 anos)	0,35	0,10 - 1,171
Nuliparidade (filhos)	1	0,23 - 4,599
Ausência de amamentação	0,89	0,229 - 3,638
Uso de contracepção hormonal	1,89	0,58 - 6,32
Menopausa	11,14	2,73 - 45,46*
Reposição hormonal	2,12	0,38 - 11,83
Inatividade física	1,71	0,34 - 8,65
Excesso de peso	1,15	0,35 - 3,74
RCQ > 0,8	0,17	0,006 - 1,24
Etilismo	0,54	0,12 - 2,34
Tabagismo	1,51	0,32 - 8,389

*P<0,05

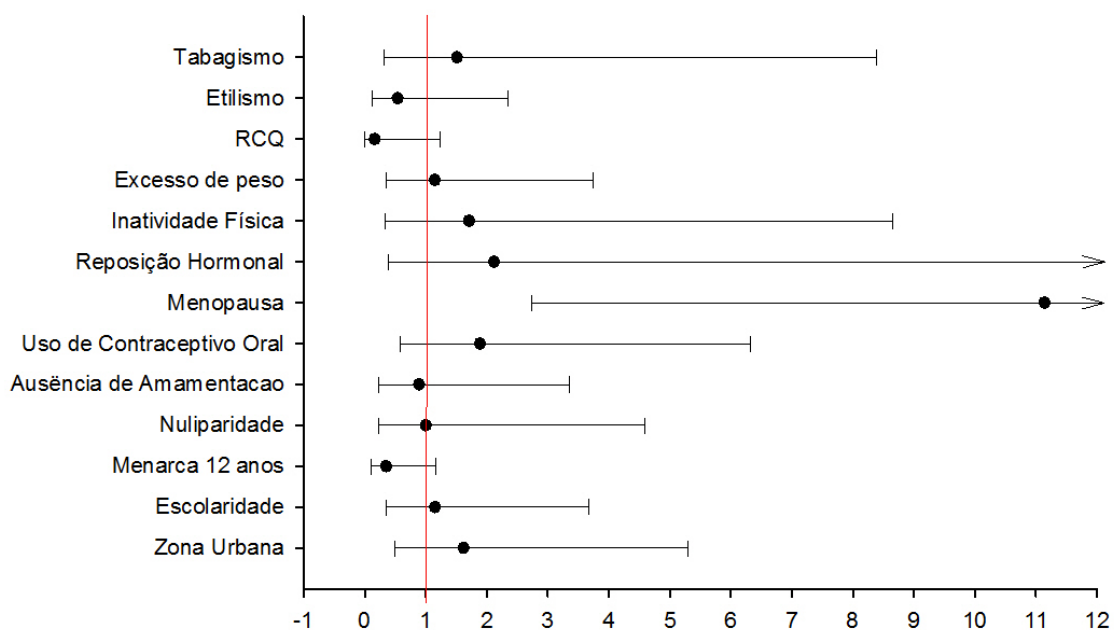


Gráfico 2- Associação entre os fatores de risco e câncer de mama.

4.3.2 Quantificação do DNA

A média das concentrações do DNA plasmático encontradas pela técnica de PCR em tempo real utilizando o GAPDH foi de 7,95 pg/mL para o GCO com desvio-padrão de $\pm 0,60$, e 7,45 pg/mL para o GCA, com desvio-padrão de $\pm 0,58$, com diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados para cada grupo pelo teste t ($P < 0,021$) (Gráfico 3). As concentrações encontradas utilizando o gene da β -actina foram menores no GCO, com média de 8,47 pg/mL e desvio-padrão de $\pm 0,19$, e maiores no GCA, com média de 9,39 pg/mL e desvio-padrão de $\pm 0,12$, com diferença estatisticamente significativa entre eles (teste t, $P < 0,000$) (Gráficos 4 e 5). Os dados encontrados utilizando o gene do GAPDH mostraram níveis mais elevados para o GCO em relação ao GCA. Esses dados foram contrários aos encontrados com a β -actina (Gráficos 3 e 4).

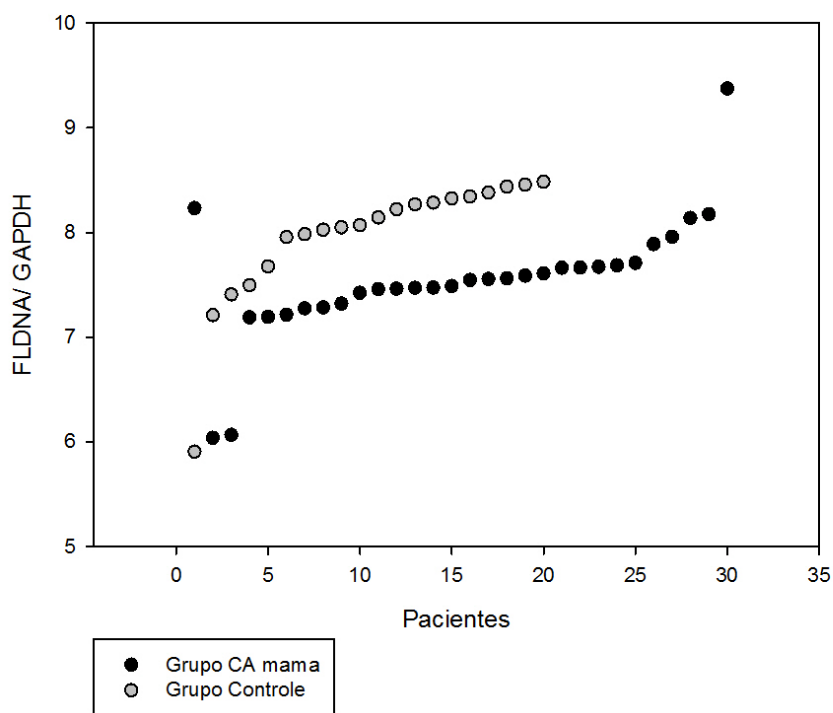


Gráfico 3- Distribuição dos valores da FLDNA utilizando o GAPDH nas pacientes do grupo controle e portadoras de câncer de mama.

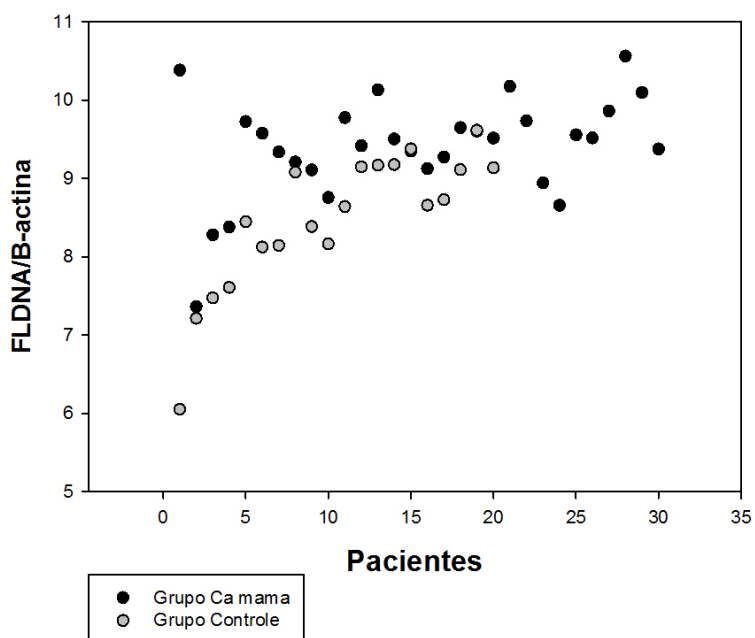


Gráfico 4- Distribuição dos valores da FLDNA utilizando a β -actina nas pacientes do grupo controle e portadoras de câncer de mama

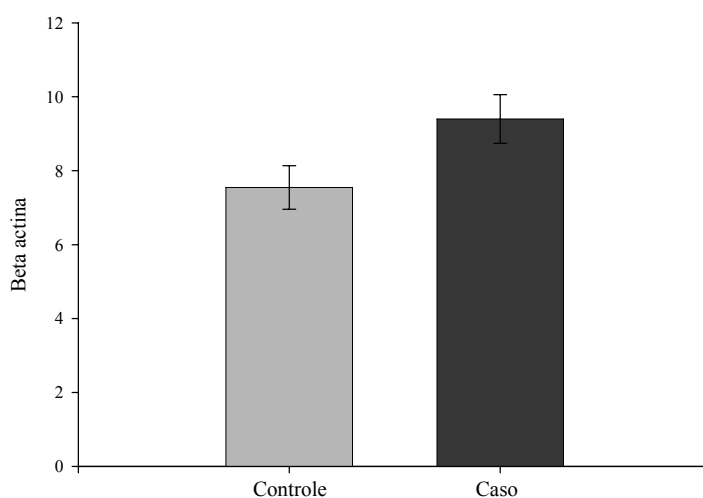


Gráfico 5- Média e desvio-padrão dos valores das FLDNA encontrados utilizando a β -actina para casos e controles ($p < 0,05$).

4.4 Discussão

Neste trabalho, as pacientes do grupo controle e casos apresentavam características semelhantes em vários aspectos, como procedência, escolaridade, a presença de filhos, amamentação, uso de contraceptivo hormonal e terapia de reposição hormonal, prática de atividade física, excesso de peso, etilismo e tabagismo. Houve diferença entre os grupos para as variáveis, com maior número de mulheres na menopausa no GCA ($p=0,0010$); menarca precoce (antes dos 12 anos) e RCQ maior que 0,8, com mais mulheres no GCO com essas características ($p=0,045$, e $p=0,044$, respectivamente), mas sem conferir associação de risco (Tabelas 2, 3 e 4). Para as variáveis HFCA e HPBD, a diferença encontrada foi significativa, com maior número de mulheres com ambas as características no GCA, mas não foi possível a avaliação da associação de risco por não haver mulheres no GCO com exposição a esse fator. Em relação à RCQ, essa variável já havia sido anteriormente descrita em associação com o Ca de mama, mas os resultados encontrados neste trabalho não mostraram associação com a patologia (KAAKS *et al.*, 1998). É descrita a associação entre a história pessoal progressiva de doença benigna da mama e o desenvolvimento de neoplasia de mama (KLUTTIG e POKRZYWNIAC, 2009). Para a RCQ, apesar de a diferença entre os grupos ser atribuída ao GCO mais exposto, isso não conferiu aumento ou redução de risco. A única variável associada ao aumento de risco neste trabalho foi a presença de menopausa ($p=0,001$, OR 11,14, IC 2,73 – 45,46). Já foi descrita na literatura a elevação

da incidência do Ca de mama com o envelhecimento natural da mulher, principalmente após os 50 anos (HOWLADER *et al.*, 2009). Na população estudada, 86,6 % das mulheres do GCA estavam na menopausa e possuíam média de idade de 53,4 anos, enquanto que nas do GCO 35 % já estavam na menopausa e o grupo era mais jovem, com média de 47,75 anos.

O diagnóstico de tumores sólidos, como o de mama, é realizado de maneira invasiva, por meio da retirada do tumor cirurgicamente ou por biópsia da lesão primária ou metastática. A possibilidade de utilizar amostras de sangue periférico para o diagnóstico de neoplasia ou para seguimento e quantificação tumoral traria conforto para o paciente, praticidade, rapidez para a realização dessa avaliação, pelo fácil acesso ao material a ser analisado e menor invasividade da coleta de sangue periférico (ZIEGLER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, as frações livres de DNA no plasma de pacientes com Ca de mama e em controles saudáveis foram quantificadas utilizando-se o PCR em tempo real.

Os estudos apresentados anteriormente utilizam um único marcador para realizar a quantificação da FLDNA. Não foram descritas anteriormente a utilização e a comparação entre diferentes genes utilizados para essa quantificação numa mesma amostra. São encontrados valores elevados em pacientes portadoras de neoplasia em relação aos valores encontrados em pacientes com doença benigna ou grupo controle (GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006), mesmo utilizando marcadores diferentes de maneira isolada, como a β -globina (GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006) e GAPDH (ZHONG *et al.*, 2007; TARHOUNY *et al.*, 2008). Os valores variam entre os trabalhos, talvez atribuídos à possível diferença de metodologia.

Este estudo encontrou valores da dosagem de FLDNA para o grupo de portadores de neoplasia inferiores aos publicados. Enquanto os valores médios encontrados neste trabalho no GCA e GCO foram de 9,39 e 8,47 ng/ml, respectivamente, dados da literatura mostraram resultados da ordem de 221 ng/ml e 63 ng/ml no GCA e GCO (GAL *et al.*, 2004), e 13, 19 e 65 ng/ml no GCO, grupo doença benigna e GCA (ZHONG *et al.*, 2007). A diferença na metodologia utilizada poderia explicar esse resultado. Neste trabalho, foi utilizado o Syber Green, enquanto outros trabalhos utilizaram TAC MAN. Os *primers* utilizados foram GAPDH e B-actina, esta última nunca anteriormente utilizada em pacientes com câncer de mama.

Não há relato de maior especificidade de um marcador ou outro em relação à patologia de mama, ou a outra patologia específica. Neste trabalho, a comparação das

mesmas amostras de diferentes marcadores/*primers* mostrou resultados diferentes em relação à mesma patologia. Os resultados não permitem correlacionar os valores encontrados com o GAPDH ao diagnóstico da patologia. Para a β -actina, pode-se inferir melhor correlação entre os valores elevados encontrados no GCA e a presença da patologia de mama maligna, mas não são suficientes para utilizá-los como teste diagnóstico.

Os resultados encontrados utilizando GAPDH diferem do demonstrado anteriormente (ZHONG *et al.*, 2007; TARHOUNY *et al.*, 2008; KOHLER *et al.*, 2009). Enquanto na literatura foram descritos valores mais elevados nas pacientes com Ca de mama, neste estudo os controles apresentaram valores maiores em relação às portadoras de neoplasia de mama (7,95 ng/mL e 7,54 ng/mL respectivamente, $p < 0,02$). Os valores obtidos utilizando a β -actina foram semelhantes aos descritos na literatura utilizando-se outros genes (GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006), com valores de média no GCA maiores em comparação com os do GCO (média de 9,39 ng/mL e 8,47 ng/mL, respectivamente $p < 0,000$), podendo demonstrar maior capacidade da β -actina em marcar os FLDNA nas pacientes portadoras de neoplasia de mama.

Na metodologia utilizada, a escolha do *Syber Green*® justificou-se por experiências prévias eficazes na quantificação de frações livres de DNA em outros tumores, assim como a utilização da β -actina (ELLINGER *et al.*, 2008a; ELLINGER *et al.*, 2008b; ELLINGER *et al.*, 2009), cujos resultados evidenciaram níveis aumentados dessas frações em pacientes portadores de neoplasias urológicas.

Para que trabalhos com resultados semelhantes pudessem ser usados para justificar a utilização dessa metodologia como método diagnóstico ou mesmo prognóstico, eles deveriam utilizar metodologias semelhantes para que seja definido, entre as diversas opções, a mais adequada e reprodutível para esse fim, já que este é um método de fácil utilização em escala populacional, pouco invasivo e capaz de auxiliar o médico a planejar a terapêutica mais adequada para cada paciente.

Estudos posteriores são necessários para comprovar essa hipótese, assim como para a normatização da metodologia, já que resultados positivos com a correlação da elevação das FLDNA com diversas neoplasias foram encontrados por diversos autores (LEON *et al.*, 1977; GAL *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; ZHONG *et al.*, 2007; ELLINGER *et al.*, 2008b; KOHLER *et al.*, 2009; SCHWARZENBACH *et al.*, 2009; KAMAT *et al.*, 2010).

4.5 Conclusão

A β -actina e o GAPDH foram eficazes em amplificar fragmentos livres de DNA no plasma de mulheres com câncer de mama e em controles saudáveis. A β -actina foi o marcador mais adequado para identificar as pacientes portadoras de neoplasia de mama, pois apresentavam níveis mais elevados de fragmentos livres de DNA quando comparadas aos controles saudáveis. O GAPDH não foi um bom biomarcador, uma vez que apresentou níveis mais elevados no grupo controle, podendo ser considerado neste trabalho.

De acordo com os dados apresentados, a dosagem de FLDNA não pode, à luz dos conhecimentos atuais, ser considerada um método irrefutável de diagnóstico de neoplasia, uma vez que o marcador utilizado apresentou resultado contrário aos dados anteriormente publicados.

4.6 Referências Bibliográfica

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (Eds.) **Fundamentos da Biologia Celular**. São Paulo: ARTMED EDITORA, 2.ed ed. 2007.

BOYLE, P.; LEVIN, L. *World Cancer Report 2008*. 2008.

COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. Cumulative Risk of Breast Cancer to Age 70 Years According to Risk Factor Status: Data from the Nurses' Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 10, p. 950-964, November 15, 2000 2000.

CURADO, M. P.; EDWARDS, B.; SHIN, H. R.; STORM, H.; FERLAY, J.; HEANUE, M.; BOYLE, P. (Eds.) **Cancer Incidence in Five Continents** France: International Agency for Research on Cancer(IARC) Scientific Publications, v.IXed. 2007.

DATASUS. Óbitos p/Ocorrênc por Capítulo CID-10 segundo Região Capítulo CID-10. In: BRASIL, M. D. S. (Ed.). v. 2011. n. 03/06/2011: Ministério da Saúde, Brasil, 2011. p. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

DAVIS, G. L.; DAVIS IV, J. S. Detection of circulating dna by counterimmuno-electrophoresis (cie). **Arthritis & Rheumatism**, v. 16, n. 1, p. 52-58, 1973.

DIEHL, F.; SCHMIDT, K.; CHOTI, M. A.; ROMANS, K.; GOODMAN, S.; LI, M.; THORNTON, K.; AGRAWAL, N.; SOKOLL, L.; SZABO, S. A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; DIAZ JR, L. A. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 985-990, 2008.

ELLINGER, J.; KASSEM, N. E.; HEUKAMP, L. C.; MATTHEWS, S.; CUBUKLUOZ, F.; KAHL, P.; PERABO, F. G.; MÜLLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Hypermethylation of Cell-Free Serum DNA Indicates Worse Outcome in Patients With Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 179, p. 346-352, 2008a.

ELLINGER, J.; WITTKAMP, V.; ALBERS, P.; PERABO, F. G. E.; MUELLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Cell-free DNA in Serum: a Novel Diagnostic Marker for Patients with Testicular Cancer. **European Urology Supplements**, v. 7, n. 3, p. 83-83, 2008b.

ELLINGER, J.; WITTKAMP, V.; ALBERS, P.; PERABO, F. G. E.; MUELLER, S. C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P. J. Cell-Free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients With Testicular Germ Cell Cancer. **The Journal of Urology**, v. 181, n. 1, p. 363-371, 2009.

GAL, S.; FIDLER, C.; LO, Y. M. D.; TAYLOR, M.; HAN, C.; MOORE, J.; HARRIS, A. L.; WAINSCOAT, J. S. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. **British Journal Cancer**, v. 90, n. 6, p. 1211-1215, 2004.

GANG, F.; GUORONG, L.; AN, Z.; ANNE, G. P.; CHRISTIAN, G.; JACQUES, T. Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-free DNA in Serum. **Urology**, v. 75, n. 2, p. 262-265, 2010.

GIACONA, M. B.; RUBEN, G. C.; ICZKOWSKI, K. A.; ROOS, T. B.; PORTER, D. M.; SORENSON, G. D. Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. **Pancreas**, v. 17, n. 1, p. 89-97, 1998.

HIYAMA, T.; TANAKA, S.; SHIMA, H.; KOSE, K.; TUNCEL, H.; ITO, M.; KITADAI, Y.; SUMII, M.; YOSHIHARA, M.; SHIMAMOTO, F.; HARUMA, K. Somatic mutation in mitochondrial DNA and nuclear microsatellite instability in gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 10, p. 1837 - 1841, 2003.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M. P.; LEWIS, D. R.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; CRONIN, K. A.; EDWARDS, B. K. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. In: BETHESDA, M. (Ed.). v. 2011. n. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011: National Cancer Institute, 2009.

HUANG, Z. H.; LI, L. H.; HUA, D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. **Cancer Letters**, v. 243, n. 1, p. 64-70, 2006.

INCA. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. 2009.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 50, n. 2 p. 77-90, 2004.

IRWIN, M. L.; SMITH, A. W.; MCTIERNAN, A.; BALLARD-BARBASH, R.; CRONIN, K.; GILLILAND, F. D.; BAUMGARTNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BERNSTEIN, L. Influence of Pre- and Postdiagnosis Physical Activity on Mortality in Breast Cancer Survivors: The Health, Eating, Activity, and Lifestyle Study. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 26, n. 24, p. 3958-3964, August 20, 2008.

JYLHÄVÄ, J.; KOTIPELTO, T.; RAITALA, A.; JYLHÄ, M.; HERVONEN, A.; HURME, M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: The Vitality 90+ study. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 1-2, p. 20-26, 2010.

KAACKS, R.; VAN NOORD, P. A. H.; DEN TONKELAAR, I.; PEETERS, P. H. M.; RIBOLI, E.; GROBBEE, D. E. Breast-cancer incidence in relation to height, weight and body-fat distribution in the Dutch "DOM" cohort. **International Journal of Cancer**, v. 76, n. 5, p. 647-651, 1998.

KAMAT, A. A.; BALDWIN, M.; URBAUER, D.; DANG, D.; HAN, L. Y.; GODWIN, A.; KARLAN, B. Y.; SIMPSON, J. L.; GERSHENSON, D. M.; COLEMAN, R. L.; BISCHOFF, F. Z.; SOOD, A. K. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer. **Cancer**, v. 116, n. 8, p. 1918-1925, 2010.

KLUTTIG, A.; POKRZYWNIAK, A. S. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. **Breast Care**, v. 4 p. 82-87, 2009.

KOHLER, C.; RADPOUR, R.; BAREKATI, Z.; ASADOLLAHI, R.; BITZER, J.; WIGHT, E.; BÜRKI, N.; DIESCH, C.; HOLZGREVE, W.; ZHON, X. Y. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 105, 2009.

LAZAR, L.; RIGO, J.; NAGY, B.; BALOGH, K.; MAKO, V.; CERVENAK, L.; MEZES, M.; PROHASZKA, Z.; MOLVAREC, A. Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. **BMC Medical Genetics**, v. 10, n. 1, p. 120, 2009.

LEON, S. A.; SHAPIRO, B.; SKLAROFF, D. M.; YAROS, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. **Cancer Research**, v. 37, n. 3, p. 646-650, March 1, 1977 1977.

LO, Y. M. D. Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications. **Clinical Chemistry** v. 46, n. 12, p. 1903-1906, December 1, 2000 2000.

MANDEL, P.; METAIS, T. P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, v. 142 p. 241-243, 1948.

POLYAK, K.; LI, Y.; ZHU, H.; LENGAUER, C.; WILLSON, K. V.; MARKOWITZ, S. D.; TRUSH, M. A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nature Genetics**, v. 20, p. 291 - 293, 1998.

RAPTIS, L.; MENARD, H. A. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Investigation** v. 66, n. 6 p. 1391-1399, 1980.

SAUKKONEN, K.; LAKKISTO, P.; VARPULA, M.; VARPULA, T.; VOIPIO-PULKKI, L. M.; PETTILÄ, V.; PULKKI, K. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. **Intensive Care Medicine**, v. 33 p. 1624-1627, 2007.

SCHWARZENBACH, H.; ALIX-PANABIÈRES, C.; MÜLLER, I.; LETANG, N.; VENDRELL, J.-P.; REBILLARD, X.; PANTEL, K. Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. 1032-1038, February 1, 2009 2009.

SCHWARZENBACH, H.; HOON, D. S. B.; PANTEL, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. **Nat Rev Cancer**, v. advance online publication, 2011.

STAMENIĆ, V.; STRNAD, M. Urban-rural differences in a population-based breast cancer screening program in Croatia. **Croatian Medical Journal**, v. 52 p. 76-86, 2011.

SWARUP, V.; RAJESWARI, M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids - A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 795-799, 2007.

TAN, D. J.; BAI, R. K.; WONG, L. J. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 972 - 976, 2002.

TARHOUNY, S. E.; SEEFELD, M.; FAN, A. X. C.; HAHN, S.; HOLZGREVE, W.; ZHONG, X. Y. Comparison of serum VEGF and its soluble receptor sVEGFR1 with serum cell-free DNA in patients with breast tumor. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 65-69, 2008.

TONG, B. C.; HA, P. K.; DHIR, K.; XING, M.; WESTRA, W. H.; SIDRANSKY, D.; CALIFANO, J. A. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 82, p. 170 - 173, 2003.

ZHONG, X.; LADEWIG, A.; SCHMID, S.; WIGHT, E.; HAHN, S.; HOLZGREVE, W. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 276, n. 4, p. 327-331, 2007.

ZIEGLER, A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U.; STAHEL, R. A. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? **Cancer Treatment Reviews**, v. 28, n. 5, p. 255-271, 2002.

Capítulo 5. Conclusões Finais

A inatividade física, menopausa, nuliparidade, ausência de amamentação e história familiar de câncer de mama está associado ao Câncer de mama nas pacientes atendidas na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte Minas Gerais, enquanto que o etilismo confere efeito protetor para a mesma patologia na população estudada.

O gene que codifica a β -actina é eficaz em amplificar fragmentos livres de DNA no plasma de mulheres com câncer de mama, e um biomarcador adequado para identificar as pacientes portadoras de neoplasia de mama na população.

A dosagem de frações livres de DNA plasmático ainda não pode ser considerada um método diagnóstico, pois as diferentes metodologias utilizadas não permitem a padronização do melhor marcador e valores de referência.

6.ANEXOS

ANEXO I

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
MATERNIDADE ODETE VALADARES**

**1- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL:**

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°: _____ ÓRGÃO EXPEDIDOR: _____

SEXO: _____ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

TELEFONE: (____) _____

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc): _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°: _____ ÓRGÃO EXPEDIDOR: _____

SEXO: _____ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

2- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

TÍTULO DO PROJETO: CORRELAÇÃO ENTRE FATORES DIETÉTICOS, CLÍNICOS E GENÉTICOS E A OCORRÊNCIA DE CÂNCER DE MAMA EM MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO PÚBLICO DE MAMOGRAFIA EM BELO HORIZONTE, MG.

COORDENADORA: PROFESSORA RENATA NASCIMENTO DE FREITAS / ESCOLA DE NUTRIÇÃO / UFOP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 MESES

3- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU

REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

A pesquisa que a senhora está sendo convidada a participar tem como objetivos investigar os fatores da dieta, da composição corporal e genéticos que fazem com que uma mulher tenha mais ou menos chances de desenvolver câncer de mama.

Nesta pesquisa cada participante deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe no dia da consulta no hospital. De cada participante serão também tomadas medidas de peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril e das dobras de gordura subcutânea. Se por acaso, a senhora for submetida à cirurgia ou a biópsia para diagnóstico ou tratamento, serão coletadas uma amostra de sangue (10 mL) e uma amostra de gordura da mama (0,5 a 1,0 g) retirada normalmente nestes procedimentos. O sangue e a amostra de gordura serão enviados para o Laboratório de Epidemiologia Molecular da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto para extração de DNA (material genético) e análises bioquímicas. No DNA serão pesquisados os genes da *MTHFR*, *TYMS*, *MTR*, *APOE*, *LDL-R*, *PPAR* e *FAS*. Estes genes estão relacionados ao metabolismo de gorduras e de ácido fólico (uma vitamina) que são consumidos na dieta. Existem evidências de que alguns tipos de gorduras e o ácido fólico da dieta possam estar associados com o risco de câncer de mama e é isto que queremos pesquisar. Na gordura da mama serão pesquisados os tipos de ácidos graxos (constituintes das gorduras) presentes. A partir da análise dos resultados destes dados é que pesquisaremos que características podem influenciar no desenvolvimento do câncer de mama. O material coletado para este estudo receberá um código e apenas a professora Renata Nascimento de Freitas da Universidade Federal de Ouro Preto saberá a origem do mesmo.

Este material será utilizado apenas para os estudos descritos acima e ao final, será descartado. Em nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com este material saberão que é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Nenhuma outra pessoa ou instituição, que não aquelas envolvidas no presente projeto, terá acesso aos questionários ou dados individuais gerados por esta pesquisa. Os resultados deste trabalho serão publicados apenas em veículos de divulgação científica (revistas especializadas e congressos) garantindo-se o anonimato dos participantes. Sua participação ou não neste estudo não influenciará de nenhuma forma no tipo e na qualidade do atendimento médico que você está recebendo ou poderá receber no futuro. Você poderá solicitar aos pesquisadores, a qualquer momento, o seu desligamento do estudo e a retirada dos seus dados.

Você poderá ter conhecimento, se quiser e no momento que desejar, dos resultados da avaliação nutricional e das análises bioquímicas e genéticas. Se necessário e se for de

seu interesse, nossa equipe agendará uma consulta para que a senhora receba aconselhamento genético e aconselhamento nutricional.

É através deste tipo de pesquisa e da divulgação dos resultados, que esperamos poder aumentar nosso conhecimento sobre os fatores que aumentam ou diminuem os riscos de desenvolvimento de câncer de mama. Sua participação poderá ajudar a melhorar os conhecimentos necessários para melhor orientar programas de prevenção que poderão contribuir para diminuir a ocorrência deste câncer que é o que mais mata mulheres em todo mundo.

Caso a senhora queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora, ou no futuro, poderá entrar em contato com a Profa. Renata N. Freitas na Escola de Nutrição da UFOP pelo telefone (31) 3559 1838 ou por ligação gratuita para o telefone 9 031 31 3552 0121 por e-mail: rfreitas@enut.ufop.br . Obrigada!

4- ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO

SUJEITO DA PESQUISA:

Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Acesso a qualquer tempo aos resultados desta pesquisa com aconselhamento genético e/ou nutricional se necessário.

Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

5- CONSENTIMENTO PÓS – ESCLARECIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo da pesquisa acima especificado.

Belo Horizonte, de de 200 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou representante legal.

Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado **“Correlação entre fatores dietéticos, clínicos e genéticos e a ocorrência de câncer de mama em mulheres atendidas pelo Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte, MG”**, sob responsabilidade da pesquisadora professora Renata Nascimento de Freitas, da Universidade Federal de Ouro Preto, foi **analisado e aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (CEP/FHEMIG), no dia 14 de julho de 2005, conforme parecer nº 310, e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CONEP/CNS/MS), no dia 29 de novembro de 2005, conforme parecer nº 1889/2005.

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2007.


Dr. Robespierre Queiroz da Costa Ribeiro
Coordenador do CEP-FHEMIG

ANEXO III

Questionário de Avaliação dos Fatores de Risco para Câncer de Mama

Data da avaliação: _____ Número: _____
Prontuário: _____

A. IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: _____
Identidade: _____ Órgão expedidor: _____
2. Idade: _____ Data Nascimento: _____
3. Residência atual: Rua: _____ N° _____
Bairro: _____ Cidade: _____
Tempo de residência: _____ anos Zona: (U) Urbana (R) Rural
4. Residência anterior: Rua: _____ N° _____
Zona: (U) Urbana (R) Rural Bairro: _____ Cidade: _____
5. Cidade do nascimento: _____ Estado: _____
Zona: (U) Urbana (R) Rural Tempo de residência: _____ anos
6. Situação conjugal: (IBGE/2000)
(1) Casada/ Consensual (2) Separada/Divorciada/Desquitada
(3) Solteira (4) Viúva
7. Escolaridade: (IBGE/2000-INCA/2000)
(1) Não alfabetizada
(2) Alfabetizada/Alfabetização de adultos
(3) Antigo primário incompleto/1 -3 série
(4) Antigo primário incompleto/Elementar completo/1-4-série
(5) Ginásio incompleto/5-7 série
(6) Ginásio completo/5-8 série
(7) Antigo clássico incompleto/Normal incompleto/Ensino médio incompleto
(8) Antigo clássico completo/Normal completo/Ensino médio completo
(9) Superior/Superior mestrado/Superior doutorado
8. Ocupação: _____
9. Renda líquida mensal: _____ 10. N° de membros da família: _____

B. HISTÓRIA CLÍNICA

1. História prévia de lesão benigna na mama? () Sim () Não
2. História familiar de câncer de mama? () Não há casos
() Sim há casos. Quem? () Avó () Mãe () Tia () Filha () Irmã
3. História pessoal de diabetes? () Sim () Não
4. História pessoal de gota? () Sim () Não
5. História pessoal de Insuficiência renal?? () Sim () Não

C. HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA

1. Idade da menarca: _____
2. Idade da primeira gestação completa: _____

3. Número de gestações com filhos vivos: _____

4. Número de abortos: _____

5. Número de natimortos: _____

6. Já amamentou? () SIM () NÃO

Quanto tempo amamentou seus filhos? (OMS/1992)

Filho 1	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses	Filho 2	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses
Filho 3	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses	Filho 4	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses
Filho 5	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses	Filho 6	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses
Filho 7	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses	Filho 8	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses
Filho 9	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses	Filho 10	() AME _____ meses () AMP _____ meses () AMEP _____ meses

7. Uso de contraceptivo hormonal: () Oral () Vaginal () Adesivo () Outro

Início: _____ Término: _____ Tempo: _____

8. Idade da menopausa: () SIM _____ anos. () NÃO

9. Causa da menopausa: () Espontânea.
() Radiação. () Histerectomia ou retirada dos ovários.

10. Terapia de reposição hormonal:

() Sim () Não

Nome comercial: _____ Tipo: (J) Conjugado (NJ) Não conjugado

Administração: (O) Oral (V) Vaginal (A) Adesivo () Outro

Início: _____ Término: _____ Tempo: _____

11. Utiliza(ou) algum medicamento por longo prazo? () SIM () NÃO

Qual? _____ Indicação: _____

Início do uso: _____ Término do uso: _____

12. Já fez alguma mamografia?

(S) Sim (N) Não

Com que idade fez a primeira mamografia? _____ anos.

Quando foi a sua última mamografia? _____

Desde a primeira mamografia com que frequência fez as outras?

- (1) de 6 em 6 meses.
- (2) Anualmente.
- (3) 1 vez a cada 2 anos.
- (4) 1 vez a cada 3 anos.
- (5) 1 vez a cada 4-5 anos.
- (6) 1 vez a cada 6-10 anos.

- (7) fez menos frequentemente que a cada 10 anos.
 (8) Só fez uma vez.

D.ATIVIDADE FÍSICA (AGITA/2002-INCA/2002)

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade leve- aquela na qual não há aumento dos batimentos cardíacos? _____
 Quanto tempo gasta se exercitando? _____

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade moderada e intensa- aquela na qual há aumento dos batimentos cardíacos? _____
 Quanto tempo gasta se exercitando? _____

E.ANTROPOMETRIA

Peso atual: _____ Peso usual: _____
 Altura: _____ IMC: _____
 %GC: _____
 Peso aos 18 anos: _____ IMC aos 18 anos: _____
 Circunferência cintura: _____ Circunferência quadril: _____

Ganho de peso? () SIM () NÃO Quantos quilos? _____ Quando? _____
 Perda de peso?() SIM () NÃO Quantos quilos? _____ Quando? _____

F.BEBIDAS ALCOÓLICAS

() Sim () Não () Já utilizou.

Bebida	Início	Término	Tempo	Quantidade/Recipiente	Frequência
Pinga				() copo () garrafa	() dia() sem.() mês
Cerveja				() copo () garrafa () lata	() dia() sem.() mês
Martini				() copo () garrafa	() dia() sem.() mês
Campari				() copo () garrafa	() dia() sem.() mês
Vinho				() copo () garrafa	() dia() sem.() mês
Outros				() copo () garrafa	() dia() sem.() mês

G.FUMA? () Sim () Não Tempo? _____
 Cigarros/dia? _____ Tipo cigarro: () Filtro () sem filtro () Fumo/rolo
 Já fumou? () Sim () Não Início: _____ Término: _____
 Cigarros/dia? _____ Tipo cigarro: () Filtro () sem filtro () Fumo/rolo