



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Vivian Rabello Areias

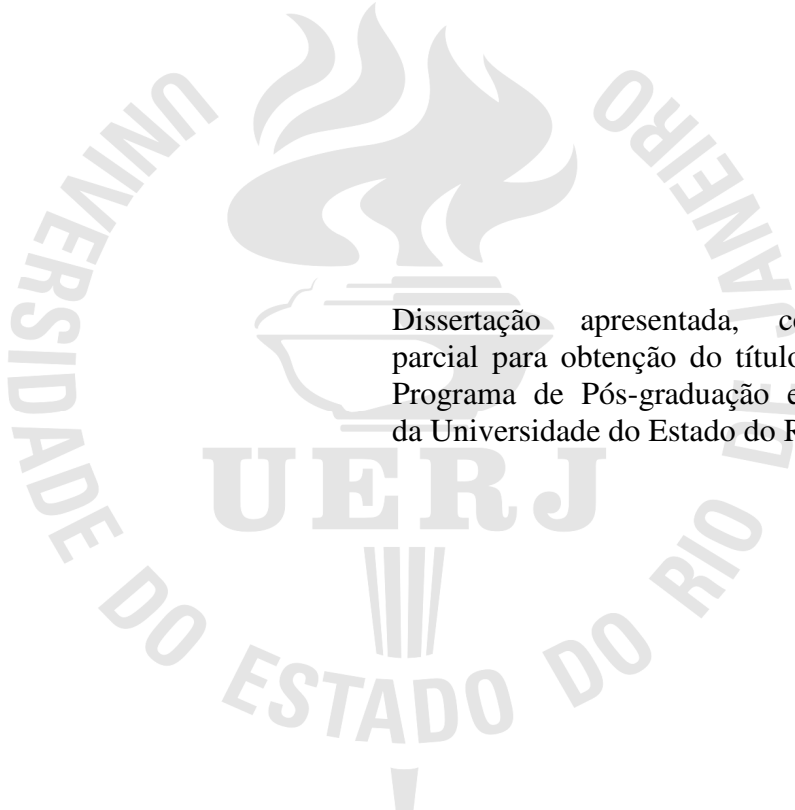
**Caracterização das lesões impalpáveis (lesões III E IV), e das alterações em
TP53 (p53) na detecção precoce do câncer de mama**

Rio de Janeiro

2011

Vivian Rabello Areias

**Caracterização das lesões impalpáveis (lesões III E IV), e das alterações em TP53 (p53)
na detecção precoce do câncer de mama**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Vitória de Moura Gallo

Coorientadora: Dra. Gilda Alves Brown

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A679 Areias, Vivian Rabello.
Caracterização das lesões impalpáveis (lesões III e IV), e das alterações em TP53(p53) na detecção precoce do câncer de mama / Vivian Rabello Areias.- 2011.
96 f. : il.

Orientadora : Claudia Vitória de Moura Gallo.
Coorientadora: Gilda Alves Brown.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Mama - Câncer - Teses. 2. Mama - Câncer - Diagnóstico. 3. Mama - Câncer - Prevenção. 4. Genes P53. I. Gallo, Claudia Vitória de Moura. II Brown, Gilda Alves. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 618.19-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Vivian Rabello Areias

**Caracterização das lesões impalpáveis (lesões III E IV), e das alterações em TP53 (p53)
na detecção precoce do câncer de mama**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de abril de 2011.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Carolina Maria de Azevedo
Hospital Universitário Gafree Guinle – UNIRIO

Prof^a. Dra. Andréa Carla de Souza Góes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Ao Senhor Deus, que é, que era e que há de vir.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida e por estar sempre presente. Sem Ele nada seria possível.

A minha família que tem me apoiado em todos os momentos da vida. Ao meu pai Antonio, a minha mãe Alzira, ao meu irmão Victor e minha “prima-irmã”, Elizabeth.

Aos meus avós José, Dina, Manoel e Rosa que apesar de não estarem mais presentes, por todo apoio e orientação. Em especial a minha avó Dina, que sempre será minha fonte de inspiração em coragem e paciência.

A meu futuro marido, Daniel, pelo amor, todo suporte, carinho, cumplicidade e companheirismo incondicional.

A amiga Danielle pela paciência e pela amizade verdadeira que começou durante a faculdade e que levarei para sempre comigo, pois é uma pessoa muito especial.

Aos amigos do laboratório de Genética Aplicada (HCI/INCA): Ana Júlia, Ana Sheila, Carol, Cintia, Daniele, Denise, Eliane, Júlio, Kethelin, Lorena, Marcus, Mariana, Roberto, Rodrigo Santana, Rodrigo Pinto, Thaíse, Vanessa e a todas as pessoas que fizeram parte desta caminhada, agradeço pela amizade, todo incentivo, ajuda e apoio para a realização deste trabalho. Vocês tornaram esta jornada muito mais agradável.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular de tumores (LBMT/UERJ): Camila, Carla, Cláudia, Evelin, Flávia, Gilson, Lara, Marina e Yasmim. Obrigada por toda a orientação e auxílio essencial durante os momentos difíceis do projeto.

Aos amigos da plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ: Aline, Paloma e Renata, por todo o apoio, paciência, orientação e as conversas nas caronas para casa.

As minhas orientadoras Claudia de Moura Gallo e Gilda Alves Brown, pela confiança, paciência, dedicação e estímulo para a investigação científica dessa dissertação.

A Professora Andréa Góes pela disposição em ajudar no desenvolvimento do projeto e correção da dissertação.

A equipe do serviço de Radiologia do HUGG. Em especial agradeço à Dra. Carolina de Azevedo por toda sua mansidão, dedicação aos pacientes e confiança na pesquisa.

A equipe do serviço de Mastologia e Radiologia do HCIII/INCA pelo carinho e apoio com que me receberam. Ao Dr. Morvan Medina e Dra. Fabíola Kestelman pelo incentivo e disponibilidade de ajudarem fornecendo o material para meu estudo.

Aos professores Dr. Antonio Fernando Catelli Infantosi e Wagner Coelho de Albuquerque Pereira, e ao aluno de doutorado André Victor Alvarenga, do programa de engenharia

biomédica (COPPE/UFRJ) pela colaboração que me deram no desenvolvimento desse projeto.

Aos órgãos financiadores: CAPES, MS e FAPERJ pelo incentivo na realização deste projeto.

Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, anseios, medos, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo para seguirmos em frente.

Autor desconhecido

RESUMO

AREIAS, Vivian Rabello. *Caracterização das lesões impalpáveis (lesões III E IV), e das alterações em TP53 (p53) na detecção precoce do câncer de mama*. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

As lesões impalpáveis da mama que muitas das vezes são assintomáticas, podem corresponder à um estágio de progressão de câncer difícil de ser detectado, durante os exames de rotina de palpação da mulher. O único método possível para a descoberta dessas lesões é através dos exames de imagem da mama, de modo geral, através da mamografia, que geralmente ocorre após os 45 anos. Devido a esses fatores, lesões impalpáveis, são frequentemente, descobertas apenas quando o estágio de desenvolvimento da doença já está avançado e as intervenções terapêuticas são menos reparadoras. Com a finalidade de iniciar a caracterização de tumores impalpáveis iniciais, objetivamos analisar o perfil genético (mutação) e epigenético (metilação de região promotora) de regiões do DNA relacionadas ao gene supressor tumoral *TP53*, provenientes de biópsias de mulheres residentes do Estado do Rio de Janeiro. Neste trabalho, foram investigadas 34 amostras de tecido de tumor de mama, por sequenciamento de DNA, nos exons de 5 a 8 do gene *TP53*. Nesta região, não foi encontrada nenhuma mutação. Este resultado pode estar relacionado ao tipo inicial de lesão, de acordo com os dados radiológicos das lesões de categorias 3 e 4 da escala BIRADS™. Para verificar o estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, analisamos 30 pares de amostras (sangue e tumor) de pacientes com suspeita de câncer de mama, pela técnica MSP-PCR. Nenhuma amostra tumoral apresentou alteração no estado de metilação na região promotora do gene *TP53*, quando comparada à amostra normal. Um motivo possível para a disparidade de resultados em relação à outros trabalhos pode ter sido a utilização da técnica. A caracterização das lesões impalpáveis apenas foi iniciada neste trabalho, no qual pudemos constatar que a mutação em *TP53* pode ser um evento mais tardio. Portanto, a lesão mamária, em suas diferentes formas, continuará a ser o assunto investigado por nosso grupo, ampliando o número de amostras e alcançando melhor conexão da conduta e dos métodos clínicos já existentes, com as novas possibilidades de diagnóstico via marcadores moleculares em tumores e fluidos biológicos.

Palavras-chave: Câncer de mama. Lesões impalpáveis. *TP53*.

ABSTRACT

Nonpalpable breast lesions that are often asymptomatic, may correspond to a stage of progression of the cancer that is difficult to be detected during routine screening. The only possible way for their discovery is through breast images preventive examinations, generally mammography, which usually occurs after age 45. Because of these factors, impalpable lesions are often discovered when the developmental stage of the disease is already advanced and therapeutic interventions are less aggressive. This study aimed to characterize impalpable tumors by the analysis of genetic (mutation and instability) and epigenetic (methylation of the promoter region) of DNA regions related to TP53 tumor suppressor gene from impalpable lesions extracted from biopsies of women living in the state of Rio de Janeiro. Were investigated 34 tissue samples from breast cancer by DNA sequencing in exons 5-8 of TP53. In this region, no mutation was found, this result may be related to the initial type of injury according to data of the radiological lesions of categories 3 and 4 of scale BIRADS™. In order to check the status of methylation of the promoter region of the TP53 gene, we analyzed 30 pairs from samples (blood and tumor) of patients with suspected breast cancer, by MSP-PCR technique. No tumor sample showed a change in the state of methylation in the promoter region of TP53 as compared to the normal sample. One possible reason for the disparity in the results between this study and the other studies may be related with the applied techniques. The characterization of the nonpalpable lesions just started this work in which we could verify that the mutation in TP53 may be a later event. Therefore, the breast lesion, in its different forms, remains the subject investigated by this group. We have been worked for expanding the number of samples, so as to link the new possibilities of molecular diagnostics in clinical practice in tumors and biological fluids.

Keywords: Breast cancer. Nonpalpable breast lesions. *TP53*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Lesões benignas não-neoplásicas da mama.....	18
Quadro 2 –	Classificação dos tumores benignos neoplásicos da mama.....	19
Figura 1 –	Fibroadenoma.....	20
Figura 2 –	Dados fornecidos pelo INCA com a estimativa dos diversos tipos de câncer na população brasileira para o ano de 2010.....	22
Figura 3 –	Densidade mamográfica.....	33
Figura 4 –	Mamografias contendo diversos tipos de calcificações	35
Figura 5 –	Metilação na posição 5 do anel de citosina.....	45
Figura 6 –	Inativação da transcrição gênica devido a hipermetilação da região promotora em célula tumoral.....	46
Figura 7 –	Esquema da estrutura do gene TP53 humano.....	47
Figura 8 –	Os domínios funcionais da p53.....	48
Figura 9 –	Análise do sequenciamento de DNA dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene TP53.....	66
Figura 10 –	Análise do perfil de metilação da região promotora do gene TP53.....	67
Figura 11 –	Eletroferograma de amostra controle, para os loci D17S796 e D17S799, respectivamente.....	90
Figura 12 –	Escada alélica do locus D17S796.....	91
Figura 13 –	Escada alélica do locus D17S799.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Acurácia de métodos de imagem utilizados na investigação mamária.....	32
Tabela 2 –	Sistema de classificação BI-RADS™	38
Tabela 3 –	Genes relacionados ao câncer de mama.....	43
Tabela 4 –	Sequências dos iniciadores dos exons do gene TP53 utilizados no projeto.....	55
Tabela 5 –	Sequência dos iniciadores para amplificação de parte da região promotora do gene supressor de tumor TP53 na técnica MSP.....	59
Tabela 6 –	Características sócio-demográficas e clínicas das pacientes.....	62
Tabela 7 –	Aspectos radiológicos das pacientes e características histopatológicas dos tumores de mama.....	64
Tabela 8 –	Alelos presentes nas amostras analisadas para o locus D17S796.....	93
Tabela 9 –	Alelos presentes nas amostras analisadas para o locus D17S799.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Radiology</i>
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMB	Associação Médica Brasileira
BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
BRCA1	<i>gene Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>gene Breast Cancer 2</i>
CAD	computer-aided diagnosis
CDI	carcinoma ductal infiltrante
CDIS	carcinoma ductal <i>in situ</i>
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CFM	Conselho Federal de Medicina
CGHFBC	<i>Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer</i>
CK5	citoqueratina basal 5
CK6	citoqueratina basal 6
CK14	citoqueratina basal 14
CK17	citoqueratina basal 17
CLI	carcinoma lobular infiltrante
CLIS	carcinoma lobular <i>in situ</i>
COPEE	Instituto Adalberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
CONEP	Conselho Nacional de Ética e Pesquisa
DNA	ácido desoxirribonucléico

DNMT	Enzima metil-transferases
DNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
DPTA	<i>ácido dietilenotriamina pentacético</i>
ECM	exame clínico da mama
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERBB2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor- 2</i>
HCIII/INCA	Unidade 3 do Instituto Nacional de Câncer
HCI/INCA	Unidade 1 do Instituto Nacional de Câncer
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LOH	perda de heterozigose
MMR	Reparo do emparelhamento errôneo
MRI	ressonância magnética
MS	Ministério da saúde
MSI	instabilidade de microssatélite
MSP	Methylation Specific PCR
NBOCC	<i>National Breast and Ovarian Cancer Center</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	tomografia por emissão de pósitrons
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
RE	receptor de estrogênio

RH	receptores hormonais
RNA	Ácido ribonucleico
RP	receptor de progesterona
RR	risco relativo
SAM	S-adenosilmetionina
SBM	Sociedade Brasileira de Mastologia
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLF	síndrome de Li-Fraumeni
STRs	<i>short tandem repeats</i>
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TNM	Tumor-Nódulo -Metástase
TP53	gene da p53
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UICC	União Internacional Contra o Câncer
ULDT	Unidades lobulares ductais terminais
US	ultra-sonografia

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	MAMA	17
1.1	Tumores de mama	17
1.1.1	<u>Tumores benignos</u>	17
1.1.2	<u>Tumores malignos ou câncer</u>	21
1.1.2.1	Incidência, mortalidade e sobrevida.....	21
1.1.2.2	Fatores de risco.....	22
1.1.2.2.1	Fatores de risco inevitáveis.....	22
1.1.2.2.2	Fatores de risco modificáveis.....	24
1.1.2.3	Tipos histológicos dos tumores malignos.....	26
1.1.2.3.1	Carcinoma.....	26
1.1.2.3.1.1	Carcinoma não-invasivo.....	26
1.1.2.3.1.2	Carcinoma invasivo ou infiltrante.....	27
1.1.2.3.1.3	Outros carcinomas.....	29
1.2	Diagnóstico.....	30
1.2.1	<u>O exame clínico das mamas</u>	30
1.2.2	<u>O exame radiológico</u>	31
1.2.2.1	Mamografia.....	32
1.2.2.2	Ultra-sonografia.....	36
1.2.2.3	Ressonância magnética.....	36
1.2.2.4	Classificação radiológica.....	37
1.2.3	<u>Perfil imunohistoquímico e molecular de carcinomas mamários</u>	39
1.3	Aspectos moleculares do câncer de mama	41
1.3.1	<u>Mutação</u>	44
1.3.2	<u>Alterações epigenéticas</u>	44
1.3.2.1	Metilação do DNA.....	44
1.4	Gene supressor de tumor TP53	47
2	OBJETIVO	51
2.1	Objetivos específicos	51
3	METODOLOGIA	52
3.1	População de estudo	52

3.2	Obtenção de amostras	52
3.3	Extração de dna genômico	53
3.3.1	<u>Tecido</u>	53
3.1.2	<u>Tecido - purificação</u>	53
3..3.3	<u>Sangue</u>	54
3.4	Eletroforese de dna genômico	54
3.5	Investigação de possível mutação no gene supressor tumoral <i>tp53</i>	55
3.5.1	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	55
3.5.2	<u>Eletroforese em gel de agarose do dna amplificado</u>	56
3.5.3	<u>Purificação dos produtos de PCR</u>	56
3.5.4	<u>Quantificação</u>	56
3.5.5	<u>Sequenciamento automático</u>	57
3.6	Métodos específicos para análise do estado de metilação do dna na região promotora do gene <i>TP53</i>	58
3.6.1	<u>Modificação do DNA com bissulfito de sódio</u>	58
3.6.2	<u>Reação em cadeia da polimerase (<i>MSP – methylation specific PCR</i>)</u>	59
3.6.3	<u>Eletroforese em gel de poliacrilamida vertical 8% não-desnaturante</u>	60
3.6.3	<u>Deteção do material amplificado por coloração com nitrato de prata</u>	61
4	RESULTADOS	62
4.1	Perfil clínico das pacientes	62
4.2	Análise da sequência dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene <i>TP53</i>	65
4.3	Análise do perfil de metilação da região promotora do gene <i>TP53</i>	67
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Perfil clínico das pacientes	68
5.2	Mutação no gene supressor tumoral, <i>TP53</i>	70
5.3	Perfil de metilação do DNA na região promotora do gene supressor de tumor <i>TP53</i>	72
6	CONCLUSÃO	75
7	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE – Padronização das Técnicas de Análise de Fragmentos	89

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença multifatorial e de comportamento heterogêneo com diferentes subtipos de tumores que variam em prognóstico e resposta a terapias (Turaga *et al.*, 2010). Por esse motivo, a prevenção se torna difícil, desencadeando altas taxas de incidência e mortalidade (Parkin *et al.*, 2005). Atualmente, é uma neoplasia de extrema importância para saúde pública em nível mundial, motivando ampla discussão em torno de medidas que promovam o seu diagnóstico precoce e, conseqüentemente, a redução em sua morbidade e mortalidade. Possui uma taxa de sobrevivência de cinco anos de 98%, entretanto, quando diagnosticada após o surgimento do tumor metastático, a taxa de sobrevivência diminui drasticamente para 27% (Howe *et al.*, 2006).

Embora vários estudos estejam ocorrendo, a etiologia do tumor de mama ainda não está totalmente compreendida. O diagnóstico é, essencialmente, baseado no estadiamento, em caracterizações morfológicas e histopatológicas. No entanto, essas abordagens possuem limitações em sua precisão e não apresentam via efetiva para prevenção (Koutras *et al.*, 2002). Diante de tal situação, é importante atentar para a utilização de métodos diagnósticos complementares. Portanto, justifica-se a procura de novos marcadores que possam prever o comportamento dos tumores, urgentemente necessária, para a detecção do câncer de mama em estágio inicial.

De um modo geral, a investigação de marcadores no câncer pode favorecer a detecção precoce da doença em pacientes assintomáticos, na avaliação e gestão da doença em suas diferentes fases, na previsão dos resultados de tratamentos e na detecção de recidivas. A investigação de alterações genéticas e epigenéticas, como marcadores, podem constituir uma ferramenta promissora ao melhor entendimento da biologia dos tumores de mama com potencial auxílio diagnóstico e terapêutico.

1 MAMA

Embora a mama seja uma glândula sudorípara modificada e de estrutura simplificada, o conhecimento de alguns componentes fisiológicos são necessários para a compreensão das doenças que a acometem. Ela é constituída por estroma de tecido conjuntivo, tecido adiposo, sistema ductal ramificado e unidades lobulares ductais terminais (ULDT). Essas ULDTs são compostas de ductos terminais que se diferenciam em ácinos e ductos coletores intralobulares, dentro do estroma intralobular especializado. Os ductos intralobulares convergem para os ductos intermediários e maiores da mama que, por fim, desembocam nos orifícios do mamilo (Hansel *et al.*, 2007).

A função primordial da mama é produzir leite e ejetá-lo sob o estímulo da sucção em condições fisiológicas, durante o período pós-parto. Seus componentes estruturais – sistema ductal, tecido conjuntivo e adiposo agem em sinergia entre si e são alvos de estímulos hormonais. Sob a ação hormonal, eles sofrem um intenso remodelamento e diferenciação durante toda vida da mulher (puberdade, idade reprodutiva, menopausa), assim como durante cada ciclo menstrual, já que ao contrário de outros órgãos, a glândula mamária não está completamente desenvolvida ao nascimento (Vorrherr, 1975; Ghosh *et al.*, 2010).

Nas mulheres jovens, o componente de sustentação representa cerca de 15% do volume mamário e constitui apenas 5% da mama de uma mulher de 60 anos (Hutson, *et al.*, 1985).

1.1 Tumores de mama

O tumor mamário é uma área definida, de consistência variada, de limites precisos ou não, que pode ser a manifestação de um simples cisto (tumor de conteúdo líquido) ou de uma massa sólida, benigno ou maligno.

1.1.1 Tumores benignos

A patologia benigna envolve entidades clínicas heterogêneas, com ampla variedade de sinônimos e discordância entre definições histológicas. Para alguns autores, são definidas como distorções que ocorrem durante o desenvolvimento e involução normais da mama (Dixon & Mansel, 1994; Nazário *et al.*, 2007). Existem muitos tipos de distúrbios da mama de natureza benigna, que podem ser não-neoplásicos ou neoplásicos.

As lesões benignas não-neoplásicas constituem a principal causa de alterações clínicas da mama e o diagnóstico mais frequente em biópsias de massas palpáveis ou de alterações detectadas pela mamografia. No quadro 1 estão representadas as principais formas de lesões benignas não-neoplásicas (Dias *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 1999).

Anomalias do desenvolvimento
Amastia e Hipoplasia
Macromastia (Hipertrofia Mamária)
Ectopia e remanescentes da linha mamária
Doenças inflamatórias
Mastites agudas e crônicas
Abscesso subareolar recidivante
Ectasia ductal
Lobulite linfocítica
Reações a prótese mamária
Doenças relacionadas à lactação
Alterações não-proliferativas ou Alterações fibrocísticas
Cistos
Metaplasia apócrina
Alterações estromais
Lesões proliferativas
Adenose
Hiperplasia ductal
Hiperplasia lobular atípica
Cicatriz radial/lesão esclerosante complexa
Lesões de células colunares
Alterações de células colunares
Hiperplasia de células colunares sem atipias
Hiperplasia de células colunares com atipias
Hiperplasia pseudo-angiomatóide
Harmatomas

Quadro 1: Lesões benignas não-neoplásicas da mama (Adaptado de Schmitt *et al.*, 1991).

Os tumores benignos neoplásicos são aqueles que possuem implicação clínica no risco aumentado para o desenvolvimento do carcinoma. No quadro 2 estão representadas as principais formas de tumores benignos neoplásicos.

Tumores epiteliais
Papiloma: único e múltiplo
Adenoma: tubular e da lactação
Papilomatose florida do mamilo
Adenomioepitelioma
Tumores mistos epiteliais e conjuntivos
Fibroadenoma
Tumor filóide
Tumores mesenquimais
Lipoma
Hemangioma
Fibromatose
Miofibroblastoma
Neurofibroma
Leiomioma
Tumor de células granulares
Outros
Tumores cutâneos

Quadro 2: Classificação dos tumores benignos neoplásicos da mama (Adaptado de Schmitt *et al.*, 1991).

Dentre todos os tumores benignos, o fibroadenoma é a segunda neoplasia mais frequente da glândula mamária e assintomática em 25% dos casos, sendo o motivo pelo qual está detalhado. É uma lesão mamária que pode ocorrer desde a menarca até a senilidade, sendo mais comum em mulheres com menos de 35 anos (Alle *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1998). Normalmente, a consistência é fibroelástica, mas pode ser endurecida quando há deposição de calcificação distrófica no nódulo. Seu desenvolvimento é lento, mas progressivo

(Nazário *et al.*, 2007). Específicos tipos de câncer, chamados tumores circunscritos, podem simular um fibroadenoma, portanto, se faz necessário a confirmação histopatológica para o diagnóstico (Barros *et al.*, 1999) (Figura 1).

Alguns estudos indicam o fibroadenoma como fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma mamário, principalmente o fibroadenoma complexo, que é conceituado como aquele que possui alterações císticas, papilares, adenose esclerosante ou calcificações epiteliais no seu interior (Pick & Iossifi, 1984; Dupont *et al.*, 1994). Porém, a frequência de transformação maligna é muito baixa (0,1 a 0,3% dos casos), ocorrendo em faixa etária dos 40 aos 45 anos (Nazário *et al.*, 2007).

Devido ao universo multiforme desses tumores de mama, existe a dificuldade de se obter um diagnóstico de benignidade absoluta. Por esse motivo, se faz necessário recorrer a condutas mais invasivas que permitam diferenciá-los de possíveis cânceres. Até o momento, para as lesões benignas em geral, a conduta está baseada no emprego de diagnóstico por imagem e procedimentos de biópsia, seguido de acompanhamento clínico e radiológico em tumores menores; e também o tratamento cirúrgico com exérese simples nos casos de crescimento progressivo de tumores com diâmetro maior do que 2 cm (Adler *et al.*, 1990).

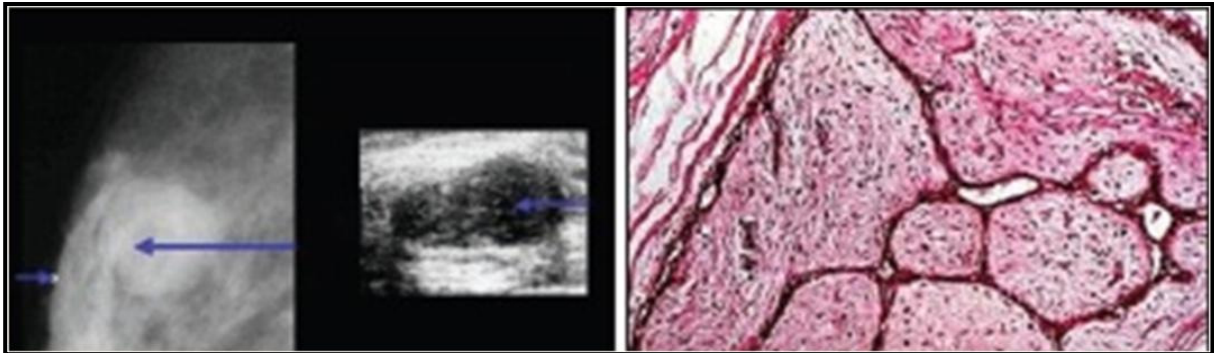


Figura 1: Fibroadenoma. A) aspecto mamográfico (à esquerda), evidenciando imagem ovóide, bem delimitada e circunscrita (seta), e aspecto ultra-sonográfico (à direita), exibindo imagem ovóide, de contornos regulares e com diâmetro anti-radial (largura) maior que o radial (altura); B) Aspecto anátomo-patológico, no qual se pode observar crescimento expansivo fibroepitelial (Nazário *et al.*, 2007).

1.1.2 Tumores malignos ou câncer

O câncer de mama é um tumor maligno, originado de células epiteliais da mama, que é observado como um tumor de consistência dura, de limites mal definidos, de tamanho que pode variar de 1 até vários centímetros de diâmetro, de acordo com o tempo de evolução. A mobilidade do tumor pode estar preservada ou aderida à pele, ao gradil costal ou a ambos. A pele que recobre a mama pode estar íntegra, ulcerada pelo tumor ou apresentar-se como uma casca de laranja. Pode se apresentar de forma singular, onde o tecido mamilar apresenta somente um tipo histológico de conteúdo maligno ou de forma mista, onde apresenta mais de um tipo histológico no conteúdo tecidual avaliado.

1.1.2.1 Incidência, mortalidade e sobrevida

A distribuição da incidência e da mortalidade por câncer é importante para o conhecimento epidemiológico da doença, desde seus aspectos etiológicos até os fatores prognósticos envolvidos em cada tipo de câncer. Este conhecimento possibilita gerar hipóteses causais e avaliar os avanços científicos em relação às possibilidades de prevenção e cura, bem como a resolutividade da atenção à saúde (Ministério da Saúde - MS, 2007).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (MS, 2009). Nas últimas três décadas, sua incidência aumentou estando, principalmente, relacionada à crescente utilização do rastreamento e detecção precoce (Scowitz *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2007). Por outro lado, o retardamento do diagnóstico e da instituição de terapêutica adequada ainda está presente na clínica, aumentando assim os índices de mortalidade (Ernster & Barclay, 1997; Duffy *et al.*, 2008).

A sobrevida para esse tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial. Na população mundial, a sobrevida média, após cinco anos, é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, e nos países em desenvolvimento diminui para 57% (MS, 2009).

No Brasil, o número de casos novos de câncer de mama esperados em 2010 é de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. E em sua região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil (MS, 2009).

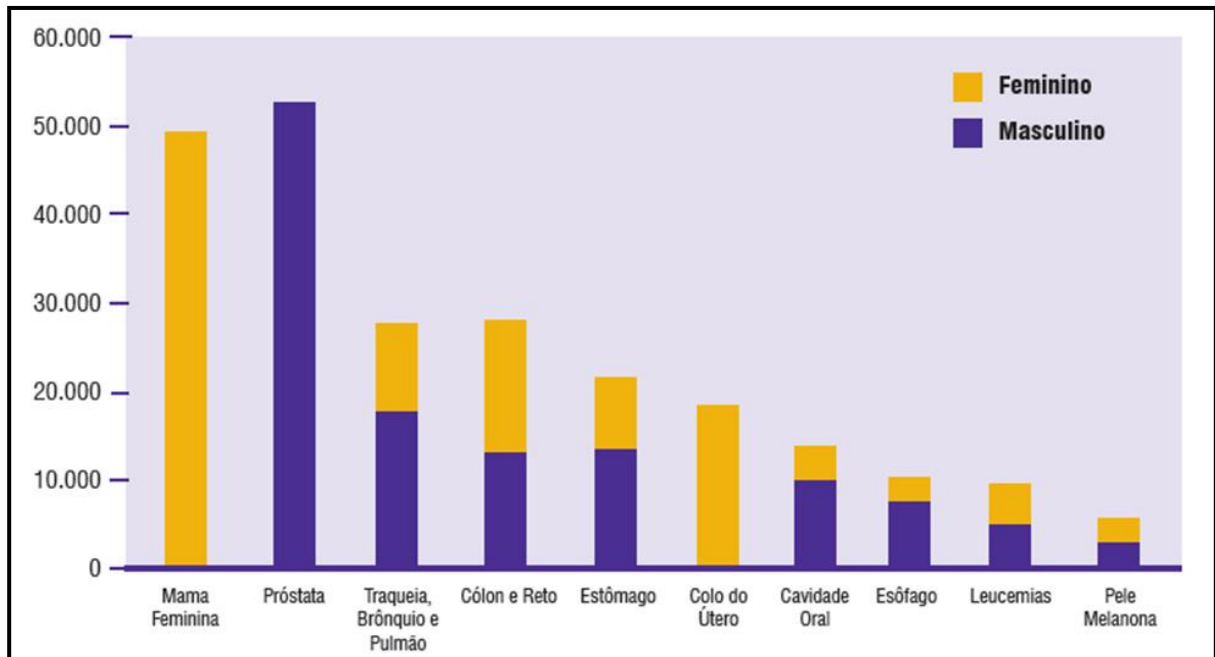


Figura 2: Dados fornecidos pelo INCA com a estimativa dos diversos tipos de câncer na população brasileira para o ano de 2010. O tumor de pele não melanoma não foi incluído no gráfico, pois é o mais incidente (MS, 2009).

1.1.2.2 Fatores de risco

A probabilidade de um indivíduo desenvolver o câncer de mama é influenciada por combinações de diversos fatores de risco. Segundo a *American Cancer Society -ACS*, 2009a, existem duas classes de fatores de risco: os inevitáveis, ou seja, aqueles que não se pode modificar e os modificáveis, que dependem do comportamento assumido por cada indivíduo.

1.1.2.2.1 Fatores de Risco Inevitáveis

- a) Idade: 75% a 80% dos casos de câncer de mama ocorrem em mulheres com mais de 50 anos. A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco para a maioria dos cânceres, provavelmente porque, ao longo dos anos de vida, o indivíduo vai acumulando mutações. Para o câncer de mama, esse fator tem sido associado ao início da menopausa (*National Breast and Ovarian Cancer Centre - NBOCC*, 2009; Wei *et al.*, 2010).

- b) Sexo feminino: A cada 100 mulheres com câncer de mama, existe um homem que desenvolverá a doença. Assim, o principal grupo de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são as mulheres (Sociedade Brasileira de Mastologia - SBM, 2007; Comet *et al.*, 2009; ACS, 2009b).
- c) Histórico reprodutivo: menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (depois de 50 anos de idade) aumentam o risco para o câncer de mama. Já a paridade diminui o risco (Falkenberry & Legare, 2002; MS, 2009).
- d) Patologia anterior de mama: O fato de ter desenvolvido câncer de mama no passado, também se apresenta como forte fator de risco para um novo tumor (Agrawal *et al.*, 2007; Ghosh, *et al.*, 2010). O Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2009, alerta que o risco de desenvolver câncer posterior de mama aumenta cerca de 1% ao ano.
- e) Tecido mamário denso: Mulheres com a mama densa, ou seja, rico em tecido glandular, tem mais risco de desenvolver câncer de mama. O tecido denso também pode dificultar a detecção de alterações na mamografia (ACS, 2009b; Ghosh *et al.*, 2010).
- f) História familiar: Apenas 10% dos casos de câncer de mama estão ligados a predisposições genéticas (Falkenberry & Legare, 2002; Antoniou & Easton, 2006). Ainda assim, são capazes de aumentar o risco, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas por câncer de mama antes dos 50 anos de idade. Esse risco relativo foi avaliado em 1,80, 2,93 e 3,90 quando, 1, 2, 3 ou mais parentes de 1º grau do probando, respectivamente, são afetados pela doença, e aumenta ainda mais quanto mais jovem for o probando e quanto mais jovem for o parente quando diagnosticado (Pharoah *et al.*, 1997; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer - CGHFBC, 2001; NBOCC, 2009).
- g) Fatores genéticos: Algumas alterações genéticas, independente ou não de fator de hereditariedade, podem atuar aumentando a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver câncer de mama, podendo elevar os níveis de predisposição ao desenvolvimento da doença em até 200 vezes (Singletary, 2003). Por exemplo, mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (MS, 2009).

1.1.2.2.2 Fatores de risco modificáveis

- a) Peso corpóreo: quando o índice de massa corpórea (peso dividido pela altura ao quadrado) ultrapassa o índice de 35, em mulher no período de menopausa, seu risco duplica (Vachon *et al.*, 2007).
- b) Dieta: Hábitos alimentares, como o consumo de produtos industrializados, com utilização de conservantes (detentores de nitritos) e outros produtos químicos, também constituem fatores que podem influenciar o desenvolvimento do câncer de mama. O consumo exagerado ou permanente de açúcares refinados e gordura animal também facilita o surgimento de câncer de mama nas mulheres. Neste sentido, a dieta pobre em fibras também predispõe à enfermidade (Wei *et al.*, 2010).
- c) Exposição à carcinógenos: O consumo de álcool e cigarro, mesmo que em quantidade moderada, são identificados como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. A ingestão de álcool excessiva pode resultar em alterações nos níveis de hormônios no sangue, principalmente o estrogênio (Zang *et al.*, 2007).
- d) Exposição à radiação ionizante: a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, aumenta o risco de desenvolver câncer de mama, particularmente durante a puberdade. Ainda que seja para tratamento de outro tipo de câncer, a radioterapia pode aumentar o risco para o câncer de mama em 10 vezes em meninas menores de 10 anos (Wei *et al.*, 2010).
- e) Uso corrente de contraceptivos orais: Quando se emprega anticoncepcionais, aumenta-se o nível de estrógeno, já que se soma a este a quantidade de estrógeno produzida pela própria mulher. Ainda é controvertida a associação do uso de contraceptivos orais com o aumento do risco para o câncer de mama. Destacam-se certos subgrupos de mulheres como as que usaram contraceptivos orais de dosagens elevadas de estrogênio, as que fizeram uso da medicação por longo período e as que usaram anticoncepcional em idade precoce, antes da primeira gravidez (Porter *et al.*, 2009).
- f) Reposição hormonal: a utilização de reposição hormonal, que também age diretamente nos níveis séricos de hormônios gonadotróficos, influencia na suscetibilidade do

desenvolvimento do câncer de mama. Porém, a influência da reposição hormonal cessa após 4 ou 5 anos da interrupção deste tratamento (Steinberg *et al.*, 1991).

- g) Primeiro filho: Alguns estudos demonstram que a primeira gravidez completa antes dos 18 anos está associada com metade do risco quando comparada com uma gravidez com mais de 30 anos. A amamentação também é um fator protetor, pois mulheres que amamentaram por mais de 1 ano tem o risco reduzido significativamente em comparação com aquelas que não amamentaram (Falkenberry & Legare, 2002).
- h) Urbanização: a urbanização tem levado ao aumento da prevalência de fatores de risco de câncer de mama, entre eles, a idade tardia na primeira gravidez (MS, 2009).

Por outro lado, os principais fatores associados à diminuição do risco para desenvolver o câncer de mama são: sexo masculino, menarca após os 14 anos, menopausa antes dos 45 anos, primeira gestação a termo e amamentação precoces (idade inferior a 30 anos), atividade física regular e hábitos alimentares saudáveis (baixo teor de gordura, sal e açúcar, assim como o aumento no teor de grãos integrais, tubérculos, vegetais e frutas). Portanto, a adoção de hábitos saudáveis de vida aliada às estratégias para a detecção precoce do câncer deve ser incentivada, pois o tumor maligno da mama, quando diagnosticado precocemente, é passível de cura na grande maioria dos casos.

Resumidamente, a Associação Médica Brasileira (AMB) e o Conselho Federal de Medicina (CFM) classificam as mulheres em relação ao risco para o câncer de mama em três categorias (Barros *et al.*, 2001):

- Risco muito elevado (risco relativo – $RR \geq 3,0$): quando a mãe ou a irmã apresenta câncer de mama na pré-menopausa, possui antecedente de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular *in situ* e suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA 1 e BRCA 2);
- Risco medianamente elevado ($1,5 \leq RR < 3,0$): quando a mãe ou irmã apresenta câncer de mama na pós-menopausa, nuliparidade, antecedente de hiperplasia epitelial sem atipia ou macrocistos apócrinos;

- Risco pouco elevado ($1,0 \leq RR < 1,5$): quando apresenta menarca precoce (< 12 anos), menopausa tardia (> 55 anos), primeira gestação a termo depois de 34 anos, obesidade, dieta gordurosa, sedentarismo, terapia de reposição hormonal por mais de cinco anos e ingestão alcoólica excessiva.

1.1.2.3 Tipos histológicos dos tumores malignos

Entre os tumores malignos, não há dúvida de que os carcinomas são os mais importantes por ser a neoplasia maligna visceral mais frequente em mulheres e uma das principais causas por morte em câncer.

1.1.2.3.1 Carcinoma

Os carcinomas são tumores originados de células epiteliais de revestimento. Segundo o AJCC (*American Joint Committee on Cancer*, 2002), baseado na localização e extensão, os carcinomas de mama são classificados em carcinoma *in situ* e invasor. Inicialmente, os carcinomas foram divididos em ductal e lobular, pois se pensava que tinham origens distintas. No entanto, atualmente, sabe-se que ambos se originam na ULDT. Embora haja predominância de acometimento dos ductos pelo carcinoma dito ductal e dos lóbulos pelo lobular, os critérios citoarquiteturais que permitem distinguir esses dois grandes grupos de carcinomas parecem estar relacionados mais à diferenciação do que à origem dos tumores, razão pela qual alguns autores preferem designá-los carcinomas de tipo ductal, que representam cerca de 80% dos tumores e de tipo lobular, representando cerca de 10 a 15% dos casos (Vargo-Gogola & Rosen, 2007; ACS, 2009a).

1.1.2.3.1.1 Carcinoma não-invasivo

O carcinoma não-invasivo, ou *in situ*, é caracterizado pela proliferação de células epiteliais malignas restritas aos ductos, com a manutenção da membrana basal e, portanto, sem a invasão do estroma por células tumorais. Em função da modalidade de crescimento e, sobretudo das características citológicas das células neoplásicas, os carcinomas *in situ* são subdivididos em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Filho, 2006).

a) Carcinoma Ductal *in situ*

A classificação histológica do CDIS é baseada apenas no padrão arquitetural da neoplasia. Os CDIS podem ser classificados como: comedocarcinoma, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido. No entanto, somente os tipos comedocarcinoma e micropapilar apresentam relevância clínica, o primeiro por se associar mais com focos de invasão e o segundo pela tendência à multicanaliculidade.

É um tumor quase sempre descoberto em fase subclínica, por meio de mamografia, através da presença de microcalcificações. O seu tratamento atinge índice de curabilidade próximo de 100% e é baseado em quadrantectomia ou mastectomia, dependendo da extensão do próprio tumor.

O CDIS dá origem ao carcinoma invasivo, e uma vez que as células adquirem capacidade invasiva, o risco para o desenvolvimento de metástase aumenta significativamente (Polyak, 2007; Vargo-Gogola & Rosen, 2007).

b) Carcinoma Lobular *in situ*

O CLIS é caracterizado por acometer as unidades lobulares, onde todos os ductos estão distendidos e preenchidos por uma população de células uniformes e desconectas, com baixo grau nuclear. Estudos evidenciam que a sua presença pode ser considerada como um indicador de aumento do risco relativo para o paciente desenvolver carcinoma mamário invasivo (Filho, 2006).

1.1.2.3.1.2 Carcinoma invasivo ou infiltrante

É caracterizado pela penetração neoplásica da membrana basal de um duto independentemente da coexistência de componente *in situ* e pela extensão dos agregados celulares neoplásicos no estroma mamário. Assim como os carcinomas *in situ*, também os infiltrantes são divididos em dois grandes grupos: ductais e lobulares. Além disso, existem alguns subtipos (carcinomas tubulares, medulares e mucinosos) e algumas formas especiais (doença de Paget, carcinoma inflamatório) que despertam grande interesse prático devido ao seu prognóstico peculiar (Ketterhagen *et al.*, 1984).

a) Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI)

O CDI é o tipo mais frequente de câncer de mama, compreendendo cerca de 75% de todos os tumores de mama invasivos. Representa um grupo histológico heterogêneo e engloba tipos de tumores muito distintos.

As pacientes com carcinoma ductal invasivo apresentam um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (Ketterhagen *et al.*, 1984).

b) Carcinoma Lobular Infiltrante (CLI)

O CLI representa 10% dos carcinomas invasores de mama e tem bom prognóstico, com sobrevida de 10 anos em 80-90% das pacientes. Apesar desse aspecto favorável, o carcinoma lobular invasor tem maior tendência à bilateralidade e taxa elevada de recidiva sistêmica tardia, com metástases em diferentes sítios. As variantes histológicas são os subtipos alveolar, sólido, pleomórfico e formas mistas (Ketterhagen *et al.*, 1984).

c) Carcinoma Tubular

É uma forma bem diferenciada do carcinoma de mama invasivo representando cerca de 5% a 10% dos carcinomas da mama. O carcinoma geralmente apresenta-se associado a focos de CDIS e é caracterizado microscopicamente pela presença de pequenos dutos angulados uniformes que invadem o estroma mamário. Quando não se apresenta associado a outro tipo de tumor, ou seja, está “puro”, é o de melhor prognóstico em relação aos carcinomas invasores. Uma variante é o carcinoma cribriforme invasor, constituído por massas de células pequenas e regulares que formam blocos perfurados por pequenos ácinos, conferindo aspecto cribriforme (Bonadonna *et al.*, 1997).

d) Carcinoma Medular

O carcinoma medular constitui 7% dos carcinomas de mama, é mais frequente em mulheres jovens e tem prognóstico discretamente melhor do que o CDI em geral. Dentre suas características, estão um padrão de crescimento limitado, acentuado pleomorfismo nuclear e

atividade mitótica. Células gigantes bizarras, focos de metaplasia escamosa e necrose podem estar presentes (Bonadonna *et al.*, 1997)..

e) Carcinoma Mucinoso

O carcinoma mucinoso, também conhecido como carcinoma colóide, mucóide ou gelatinoso, representa 2% dos carcinomas de mama invasivo. Manifesta-se em mulheres após a menopausa e tem bom prognóstico, com sobrevida de 10 anos em 80% a 90% dos casos (Bonadonna *et al.*, 1997).

f) Doença de Paget

Essa é uma lesão especial que, frequentemente, se manifesta como dermatite eczematóide unilateral da papila mamária, causada pela disseminação intra-epidérmica de células malignas de um carcinoma intraductal ou invasor subjacente. Esta doença pode ser tanto um sinal de neoplasia localizada e curável, quanto à primeira manifestação de carcinomas de mau prognóstico. Por isto, ela deve sempre merecer certo grau de suspeição e requer biópsia (Bonadonna *et al.*, 1997).

g) Carcinoma Inflamatório

O carcinoma inflamatório é uma forma especial de apresentação clínica do carcinoma mamário, caracterizado pelo comprometimento difuso da mama, a qual adquire características de inflamação. Clinicamente, ele apresenta sinais semelhantes ao processo inflamatório, como calor, rubor e edema. Trata-se de um tumor agressivo, fundamentalmente tratado pela quimioterapia (Bonadonna *et al.*, 1997).

1.1.2.3.1.3 Outros carcinomas

Representam menos de 1% dos carcinomas da mama e incluem subtipos histológicos como carcinoma adenóide-cístico, carcinoma secretor juvenil, carcinoma papilífero invasor, carcinoma de células acinares, carcinoma rico em lipídeos e carcinoma apócrino (Bonadonna *et al.*, 1997).

1.2 Diagnóstico

A importância do tumor varia de acordo com sua natureza que deve, portanto, ser esclarecida inicialmente através do exame clínico, a seguir com recurso de imagem, seja mamografia e/ou ultra-sonografia e ainda por meio de procedimentos ambulatoriais, quais sejam, a punção aspirativa por agulha fina (exame citológico) e a punção por agulha grossa ou “core-biopsia” (exame histopatológico) (MS, 2004).

1.2.1 O exame clínico das mamas

O exame clínico da mama (ECM) é parte fundamental da propedêutica para o diagnóstico de câncer, podendo detectar tumor de poucos centímetros, se superficial. Deve ser realizado como parte do exame físico e ginecológico, e constitui a base para a solicitação de exames complementares. Já o auto-exame das mamas, não é estimulado como estratégia isolada de detecção precoce do câncer de mama, pois não vem sendo eficiente para o rastreamento e não contribui para a redução da mortalidade. Além disso, o auto-exame traz consigo consequências negativas, por promover ansiedade, preocupações desnecessárias ou, por outro lado, uma falsa tranquilidade (MS, 2004).

A sensibilidade do ECM varia de 57% a 83% em mulheres com idade entre 50 e 59 anos, e em torno de 71% nas que estão entre 40 e 49 anos. A especificidade varia de 88% a 96% em mulheres com idade entre 50 e 59 e entre 71% a 84% nas que estão entre 40 e 49 anos (MS, 2004).

Como técnica de diagnóstico, o exame clínico pode permitir a suspeição de malignidade, mas não dá certeza de benignidade, logo raramente atinge uma conclusão. Portanto, seu objetivo principal não é o de realizar o diagnóstico, mas identificar um sinal que permita as investigações necessárias para definição do caso.

Durante o ECM, o médico pode observar sinais e sintomas sugestivos de uma possível patologia. Especificamente no câncer de mama, sinais como dor localizada, surgimento de secreções e alterações na pele que recobre a mama, incluindo abaulamentos, retrações ou um aspecto semelhante à casca de uma laranja, podem ser observados durante o momento da inspeção. No entanto, esses sintomas não costumam ser indicativos muito específicos para um tipo de tumor ou patologia da mama. Já na palpação, há a oportunidade de se verificar, com mais clareza, a presença eventual de alguma alteração circunscrita, característica de uma lesão palpável.

Os tumores palpáveis, ou seja, aqueles perceptíveis na investigação desempenhada pelo médico durante o ECM, geralmente apresentam-se como uma manifestação do grupo das alterações benignas (80%) e não aumentam significativamente o risco para desenvolvimento do câncer de mama (Boff & Wisintainer, 2006).

Por outro lado, mais dificilmente detectadas durante a palpação estão às lesões impalpáveis ou infraclínicas, onde o único método possível para sua descoberta é a realização de exames preventivos de imagem, de modo geral, através da mamografia (Santos, 1994).

Ainda assim, essa lesão pode passar despercebida por ser muito pequena (infracentimétrica), por sua localização ser de difícil acesso à palpação (prolongamento axilar ou porção profunda da mama, por exemplo), por tratar-se de mama volumosa muito densa, mama pós-cirurgia reparadora ou, ainda, de mama com intenso processo de alterações fibrocísticas (Hermann *et al.*, 1988; Adler *et al.*, 1990; Basset, 1992). Devido a esses fatores, lesões infraclínicas, são frequentemente, descobertas apenas quando o estágio de desenvolvimento da doença já está avançado e as intervenções terapêuticas são menos reparadoras.

A fim de identificar a doença mais precocemente, estratégias de intervenções passam a ser direcionadas à sua prevenção primária, com a garantia de recursos diagnósticos adequados, como o rastreamento mamográfico e o tratamento oportuno (MS, 2004).

1.2.2 O exame radiológico

A mamografia, a ultra-sonografia e a ressonância magnética desempenham papel central na detecção, no diagnóstico e na conduta das doenças mamárias. Outras técnicas de imagem têm sido estudadas nas mamas, tais como a tomografia por emissão de pósitrons (PET), a espectroscopia, a tomografia computadorizada, a tomossíntese e a ultra-sonografia com contraste, e representam uma promessa de orientação cirúrgica no intra-operatório e pós-operatório. Porém, o custo-benefício destas novas tecnologias desfavorece o seu uso rotineiro. Assim, as técnicas preconizadas como estratégias fundamentais de investigação do tumor de mama continuam sendo as inicialmente citadas. Na tabela 1, estão descritas as acurácias dos principais métodos de imagem utilizados na investigação mamária.

Tabela 1: Acurácia de métodos de imagem utilizados na investigação mamária.

Modalidade	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo de Positividade
Mamografia	63-95% (>95% palpável, 50% impalpável, em mulheres acima de 50 anos de idade / diminui para 35% em mamas densas)	83-92% 14-90% (90% palpável)	10-50% (94% palpável)
USG	68-97% (palpável)	74-94% (palpável)	92% (palpável)
MRI	86-100%	21-97% (<40% tumor maligno primário)	52%

Adaptado de Galukande & Kiguli-Malwadde, 2010.

1.2.2.1 Mamografia

A mamografia é a radiografia da mama que possibilita a detecção precoce do câncer, por ser capaz de mostrar lesões muito pequenas (de milímetros) e em fase inicial (MS, 2007). O exame mamográfico através do rastreamento tem sido o padrão-ouro para a triagem populacional de mulheres com câncer de mama por ser a única modalidade de imagem da mama que foi capaz de diminuir a mortalidade (Elmore *et al.*, 2009).

No Brasil, o rastreamento mamográfico para mulheres de 50 a 69 anos é a estratégia recomendada para controle do câncer de mama (MS, 2009). De acordo com o Documento de Consenso para Controle do Câncer de Mama, de 2004, são consideradas como principais estratégias de rastreamento um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. Para as mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama, recomendam-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos.

A sensibilidade do exame varia de 46% a 88% e depende de fatores tais como: tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário (mulheres mais jovens apresentam mamas mais densas) (Figura 3), qualidade dos recursos técnicos e habilidade de interpretação do radiologista. A especificidade varia de 82% a 99%, e é igualmente dependente da qualidade do exame (Pisano *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2007).

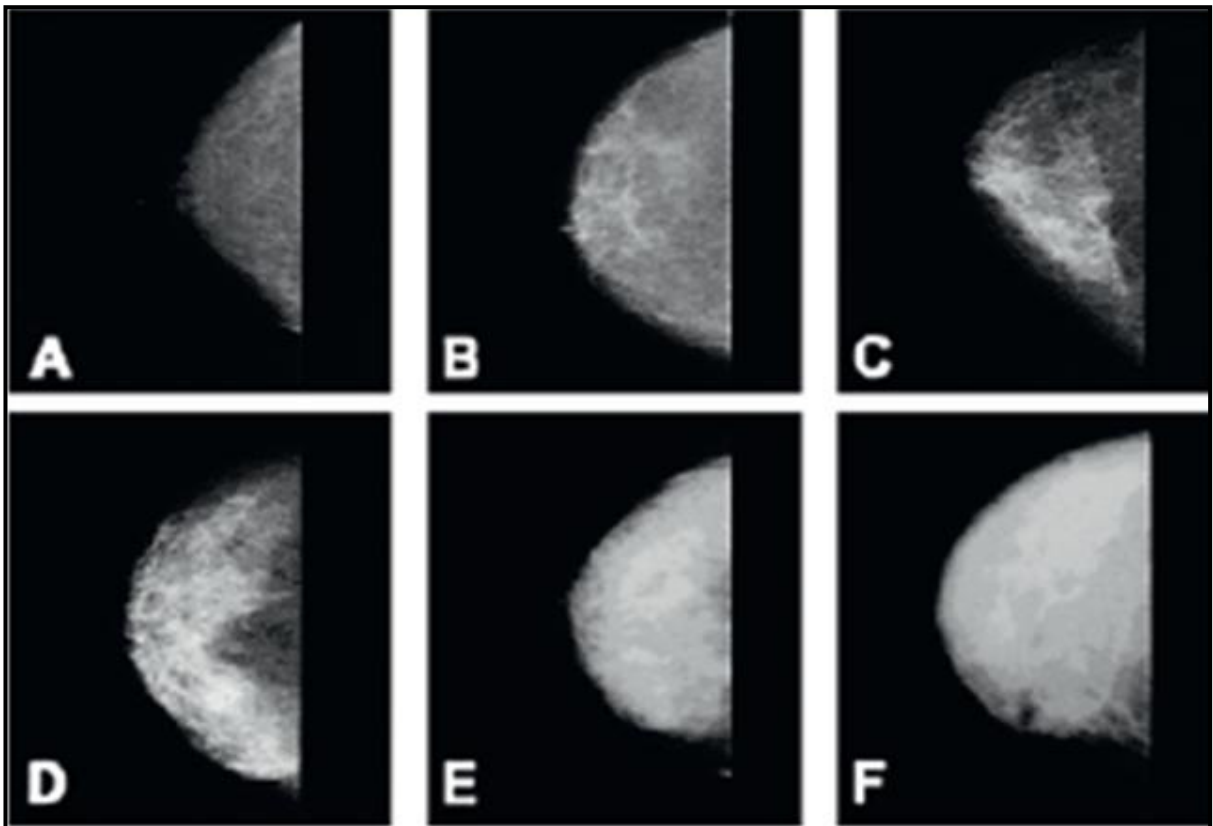


Figura 3: Densidade mamográfica. Exemplos da variação de densidade através da mamografia: (A) 0%, (B) <10%, (C) <25%, (D) <50%, (E) <75%, (F) >75% (Boyd *et al.*, 2010).

Os sinais radiológicos de malignidade são divididos em diretos e indiretos. Os sinais diretos são os nódulos, as microcalcificações e as densidades assimétricas focais ou difusas. Constituem sinais indiretos: as distorções parenquimatosas, dilatação ductal isolada, espessamento cutâneo, retração da pele e/ou complexo aréolo-papilar e linfonodopatia axilar (Canella, 1999; MS, 2007). Um dos sinais mais apreciados nos exames de mamografia é a presença da calcificação dentro das lesões da mama ou no tecido (Tse *et al.*, 2008).

Microcalcificações mamárias são minúsculas concentrações de sais de cálcio nos tecidos da mama (Figura 4). Sua origem é variada, podendo derivar de processos inflamatórios, alterações degenerativas, processos tóxicos, processos metabólicos, estases, traumatismos ou de células tumorais. Não se pode afirmar, categoricamente, a origem de uma calcificação apenas pela análise da sua forma e número, no entanto, é possível estabelecer algumas associações bastante consistentes (Kinkel *et al.*, 1994; Lambe *et al.*, 1994).

Para as lesões palpáveis, a detecção através do sinal da calcificação não é crucial para o diagnóstico, sua malignidade pode ser confirmada por outras modalidades de diagnóstico. É para o grupo de não-palpáveis que a detecção e caracterização das calcificações se faz importante (Tse *et al.*, 2008).

A calcificação é particularmente importante para o carcinoma ductal *in situ* (CDIS), que é a "fase" pré-invasiva do carcinoma invasivo. Como tal, esta lesão não possui significativo potencial metastático, e pode ser tratada de forma mais conservadora (Feig, 2000).

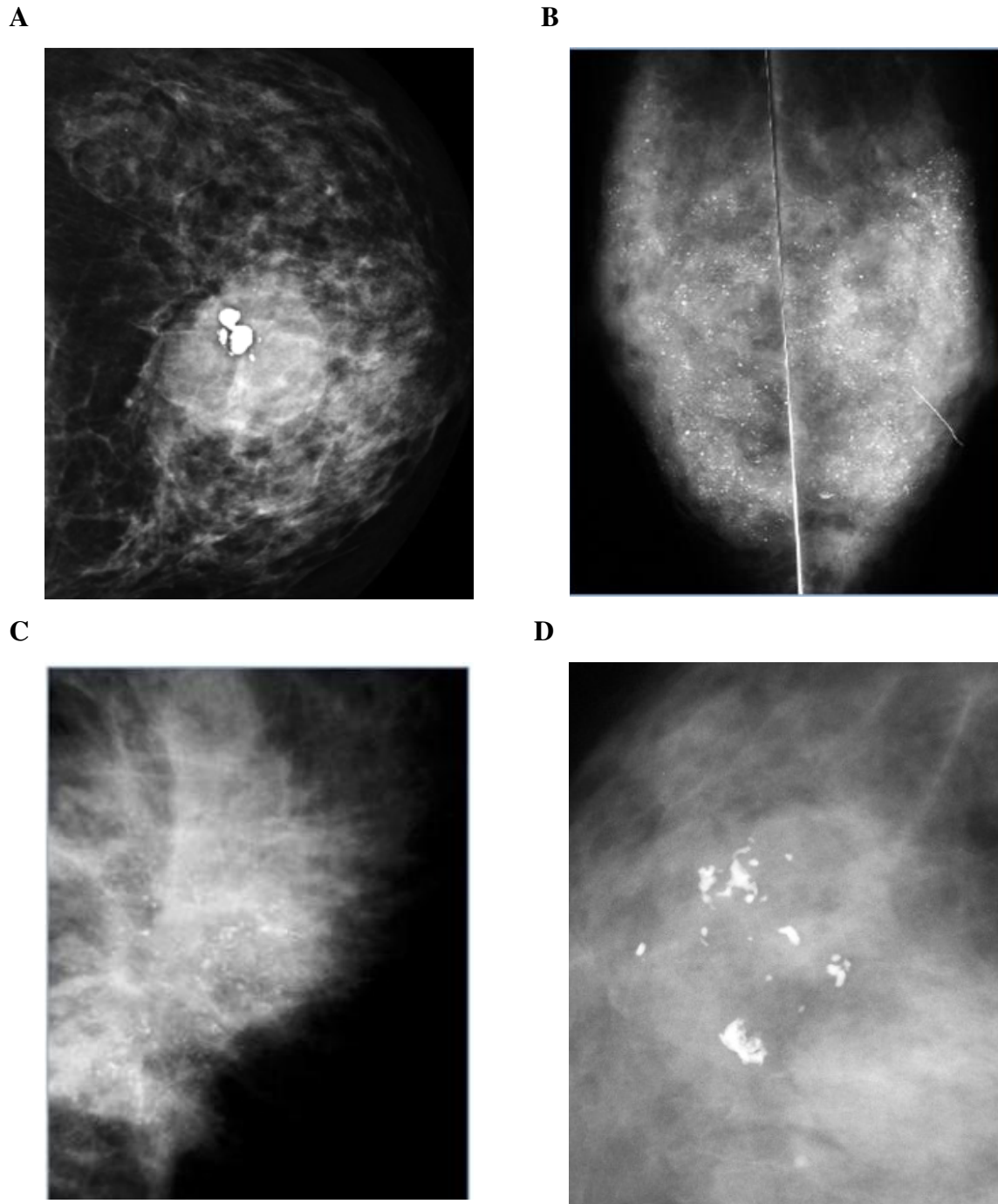


Figura 4: Mamografias contendo diversos tipos de calcificações: A: calcificação pontual; B: calcificação tipo pontual e tipo granular; C: calcificação tipo pleomórfica; D: calcificação tipo pipoca (Tanaka *et al.*, 2009; Tse *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Ultra-sonografia

A ultra-sonografia (US) é um exame que, através do registro do eco, nos dá informações da textura e conteúdo de nódulos mamários. Diretrizes internacionais recomendam que o ultrassom de mama deva ser utilizado como exame complementar, mas não como um método primário de rastreamento do câncer de mama (Albert *et al.*, 2004; *National Comprehensive Cancer Network - NCCN*, 2007; Albert *et al.*, 2009).

Esse exame possui grande aplicação na diferenciação entre tumores císticos e sólidos e também é capaz de identificar lesões no interior do cisto. Apresenta melhor resultado quando realizado em mamas densas, com tecido glandular exuberante, como as mamas das mulheres jovens.

A ultra-sonografia não é utilizada como método de rastreamento do câncer de mama, porque não tem capacidade para detectar microcalcificações que, muitas vezes, representam a única forma de expressão do câncer de mama. Outra limitação deste exame é a identificação de tumores menores que 1 cm, localizados profundamente em mamas volumosas e com grande quantidade de tecido adiposo (Galukande & Kiguli-Malwadde, 2010).

1.2.2.3 Ressonância magnética

A ressonância magnética (MRI) gera imagens através da gravação de sinais gerados após a excitação de partículas nucleares em tecidos expostos a um forte campo magnético. O MRI possui alta sensibilidade (94% - 100%), mas baixa especificidade (37% - 97%) (Reddy & Mendelson, 2005). O exame geralmente envolve o uso de um agente de contraste intravenoso, o gadolínio, ácido dietilenotriamina pentacético (DPTA), que pode localizar tumores e realçar áreas de interesse, não sendo influenciado pela mama densa (Smith, 2007).

A MRI pode fornecer informações úteis em uma série de situações clínicas especiais, incluindo: a definição de carcinoma lobular invasivo primário oculto com metástases axilares, a avaliação pré-operatória, a resposta tumoral após terapia neoadjuvante e o estabelecimento da extensão da doença. No entanto, seu custo elevado, disponibilidade limitada, baixa especificidade, falta de máquinas e metodologia padrão torna-o improvável como ferramenta de triagem para população (Schmidt & Powers, 2011).

1.2.2.4 Classificação radiológica

O modelo BI-RADS™ (*Breast Imaging Reporting and Data System*) é a classificação radiológica que tem por objetivo a padronização de laudos mamográficos levando em consideração a evolução diagnóstica e a recomendação da conduta (Tabela 2).

No Brasil, foi adotado como consenso o modelo BI-RADS™, já utilizado pelo *American College of Radiology* (ACR), visando principalmente a orientação quanto à conduta a ser tomada de acordo com achados mamográficos — negativos, benignos, provavelmente benignos, suspeitos e altamente suspeitos. Este modelo é útil como preditor de malignidade e permite acessar o valor preditivo positivo dos achados mamográficos.

Na sua quarta edição BI-RADS™ para mamografia, houve o lançamento concomitante de uma versão para ultra-sonografia - BI-RADS™ - US (Mendelson *et al.*, 2003) e outra para ressonância magnética - BI-RADS™ - MRI. Esses exames possuem características únicas a cada modalidade, mas sempre que aplicável, os termos desenvolvidos para a mamografia são utilizados. As categorias de avaliação são as mesmas para todos os termos BI-RADS™. Além disso, nesta edição foi acrescentada a categoria 6, caracterizada por achados malignos confirmados pela biópsia e a categoria 4 foi subdividida em 4a (baixa suspeita de malignidade), 4b (intermediária suspeita de malignidade) e 4c (suspeita moderada), sendo opcional o seu uso.

Tabela 2 – Sistema de classificação BI-RADS™ (quarta edição)

Categoria	Alteração observada	Avaliação	Conduta
0	Existe alteração radiológica, mas sem definição	Inconclusivo	Necessária a realização de método de imagem adicional
1	Não há alterações radiológicas	Normal	Reavaliação radiológica em um ano
2	Alterações radiológicas benignas	Benigno	Reavaliação radiológica em um ano
3	Alterações radiológicas provavelmente benignas	Provavelmente benigno	Reavaliação radiológica em seis meses, seguido de exames adicionais em longo prazo (2 anos ou mais). Há ocasiões em que a biópsia é feita.
4	Alterações radiológicas que tem um espectro amplo de malignidade	Suspeito de malignidade	Necessário o prosseguimento da investigação diagnóstica - biópsia
5	Alterações radiológicas altamente suspeitas, com risco maior que 95% de serem malignas	Altamente sugestiva de malignidade ($\geq 95\%$).	Necessário o prosseguimento da investigação diagnóstica - biópsia
6	Lesão comprovadamente maligna	Lesão diagnosticada como maligna, mas não tratada	-

Adaptado de Quadros, 2003.

1.2.3 Perfis imunohistoquímico e molecular de carcinomas mamários

Em aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama, há superexpressão de receptores de estrogênio e de receptores de progesterona na membrana plasmática das células cancerígenas. O estrogênio e a progesterona são hormônios que atuam como fatores de sinalização de crescimento e divisão celular, promovendo a multiplicação celular. Algumas mutações no gene do receptor de estrogênio, denominadas mutações ativadoras, podem desencadear uma super sinalização por esses receptores sem a necessidade de ligação ao seu agonista. Com isto, cascatas de divisões celulares se sucederão e as células estarão mais expostas a falhas na replicação do DNA. Além disso, outra figura importante do perfil imunohistoquímico é o receptor tipo 2 do fator de crescimento epitelial humano, o HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor-type). A superexpressão da proteína HER-2 nas células pode desencadear uma proliferação celular acelerada e angiogênese, além da inibição de apoptose. Devido a isto, tumores HER2-positivo são mais agressivos e levam a um pior prognóstico, quando comparado a tumores HER2-negativo.

Mais recentemente, o perfil molecular para carcinomas de mama vem sendo agregado como classificação. Essa classificação foi realizada inicialmente pela identificação dos perfis de expressão gênica em estudos com cDNA *microarrays*, baseados na presença dos receptores hormonais (RH), receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), e na amplificação do oncogene *ERBB2* que codifica para o *HER2* (Perou *et al.*, 2000; Mullan & Millikan, 2007).

Conforme esse sistema foi sendo aperfeiçoado, outros parâmetros, como tempo de sobrevida e tempo livre de doença foram inseridos (Bertucci *et al.*, 2006). De acordo com esta técnica, os carcinomas de mama foram subdivididos em cinco grupos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal *breast-like* (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2006).

O subtipo luminal A, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 negativo, foi caracterizado pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos. O subtipo luminal B, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 positivo, foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais. Este fenótipo está associado à pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (Eisenberg, 2004).

O subtipo superexpressão do HER2, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 positivo, foi caracterizado pela superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, o HER2. A amplificação do oncogene HER2 e, concomitantemente, a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama (Sorlie *et al.*, 2006). Estes tumores apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab (Eisenberg *et al.*, 2004).

O subtipo basal, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 negativo, foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais (Constantinidou *et al.*, 2010). Este fenótipo mostra positividade para CK5, CK6, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63, que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais (Dufloth, 2004). Este perfil está ligado a mutações genéticas no gene BRCA1 (Paredes *et al.*, 2007) e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico e não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos. Portanto, não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas, nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (Matos *et al.*, 2005).

O subtipo normal *breast-like* foi o último grupo a ser identificado Perou *et al.*, (2000) caracterizado pelo aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal (Perou *et al.*, 2000). Apesar disso, atualmente ainda não está clara sua distinção nem seu valor clínico (Sorlie, 2004).

De uma maneira geral, as pacientes com o subtipo luminal A apresentam melhor prognóstico quando comparadas as pacientes com outros subtipos de tumor. O subtipo basal é o que apresenta pior prognóstico, pois cerca de 80 a 90% destes tumores são triplo-negativos, os quais não respondem a terapias hormonais (por exemplo, a droga antiestrogênica tamoxifen) nem a herceptina (anticorpo 23 monoclonal que atua especificamente nos receptores HER2) (Shipitsin *et al.*, 2007).

Alguns subtipos de tumores apresentam alterações genéticas específicas e diferentes perfis de expressão gênica em resposta à quimioterapia (Troester *et al.*, 2004), sugerindo que estes cinco subtipos de carcinoma mamário representam doenças distintas (Bertucci *et al.*, 2005). Esses subtipos são conservados entre diferentes grupos étnicos (Yu *et al.*, 2004), evidenciando ainda mais a importância dessa classificação para o prognóstico e o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama.

1.3 Aspectos moleculares do câncer de mama

A busca por marcadores biológicos, na avaliação dos indicadores preditivos e prognósticos de pacientes com câncer, tem sido uma prática intensa na atividade oncológica. Marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros fluidos biológicos, primariamente produzidos pelo tumor ou secundariamente pelo paciente em resposta à presença deste (Eisenberg & Koifman, 2001).

Os avanços no conhecimento da biologia molecular têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e diferenciação celular na tumorigênese, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais (Liu *et al.*, 2010).

A iniciação e a progressão do câncer são motivadas pelo acúmulo de alterações herdadas ou adquiridas no DNA. Essas alterações podem ser genéticas ou epigenéticas na natureza. Quando genéticas, modificam a sequência do DNA, como as mutações propriamente ditas e as instabilidades; quando epigenéticas, as modificações na estrutura do DNA não implicam sua sequência (Russo *et al.*, 1996).

As principais anormalidades no DNA observadas no câncer incluem a expressão aumentada de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase e alterações epigenéticas (Fearon & Vogelstein, 1990; Clevers, 2004).

Os proto-oncogenes codificam componentes da cascata de sinalização que regulam a proliferação celular e o controle da maquinaria do ciclo celular. A sua ativação pode ocorrer por mutação, translocação cromossômica, aneuploidia e amplificação gênica (Croce, 2008). Quando mutado, um proto-oncogene se transforma em um oncogene, ocorrendo a perda do seu controle normal na regulação do crescimento, o que contribui para a proliferação aumentada de certos produtos protéicos, desregulação da divisão celular e o consequente fenótipo maligno da célula (Sugimura, 1998). Os oncogenes são homólogos na sequência aos genes normais (proto-oncogenes) e foram primeiramente identificados em retrovírus capazes de induzir tumores em animais e células transformadas *in vitro*.

Os genes supressores de tumor, por sua vez, atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada por apoptose. Alterações que inativam estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (Weinberg,

1991). Alterações nos genes supressores de tumor determinam a perda de função e são consideradas recessivas no nível celular, uma vez que a função destes genes somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (Bièche & Lidereau, 1993).

Particularmente, o câncer de mama apresenta variações genéticas, moleculares e histopatológicas que podem resultar em diferentes respostas clínicas (Vargo-Gogola & Rosen, 2007). Assim como outros tipos de cânceres, progridem pela acumulação de uma série de mudanças genéticas e fenotípicas nos mecanismos que regulam a proliferação, a diferenciação, a morte (apoptose ou necrose), o reparo do DNA e respostas celulares à terapia. Os principais genes relacionados ao câncer de mama ,presentes na na literatura, estão representados na tabela 3.

Dessa forma, o entendimento da biologia do câncer de mama, dos mecanismos que regulam os processos de iniciação e progressão tumoral e a busca por marcadores moleculares são importantes para o desenvolvimento de melhores procedimentos diagnósticos com repercussões terapêuticas e prognósticas.

Tabela 3: Genes relacionados ao câncer de mama.

Location	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
1p32	RAD54L	603615
2q33-q34	CASP8	601763
2q34-q35	BARD1	601593
3q26.3	PIK3CA	171834
5q33.2-qter	HMMR	600936
6pter-q12	NQO2	160998
8q11	RB1CC1	606837
11p15.5	SLC22A1L	602631
11q22-q23	ATM	607585
12p12.1	KRAS	190070
13q12.3	BRCA2	600185
14q32.3	XRCC3	600675
14q32.32 14q32.32	AKT1	164730
15q15.1	RAD51A	179617
16p12.2	PALB2	610355
16q22.1	CDH1	192090
17p13.1	TP53	191170
17q21	PHB	176705
17q23.2	PPM1D	605100
17q22.2	BRIP1	605882
22q11 22q12.1	CHEK2	604373

Adaptado de <http://omim.org/entry/114480>.

1.3.1 Mutação

Mutação é uma alteração de genes ou cromossomos, no material genético de uma célula, podendo conferir mudanças nas características do indivíduo. Estas modificações na estrutura do DNA também podem ser prejudiciais às células, uma vez que têm a capacidade de alterar processos vitais, como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, além de contribuir para o desenvolvimento de processos tumorais e morte celular. Qualquer célula pode sofrer mutação, tanto as germinativas quanto as somáticas.

Estas modificações na estrutura do DNA podem ser prejudiciais às células, uma vez que têm a capacidade de alterar processos vitais, como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, além de contribuir para o desenvolvimento de processos tumorais e morte celular (Alberts *et al.*, 2002).

1.3.2 Alterações epigenéticas

Alterações epigenéticas são alterações na estrutura do DNA que não impliquem alterações na sequência. Envolvem mudanças na metilação do DNA, incluindo hipometilação global e locus-hipermetilação específicas, modificações de histonas (fosforilação, metilação, acetilação) e microRNAs (Brooks *et al.*, 2009). Embora essas modificações possam potencial para a detecção precoce do câncer, esta dissertação se concentra exclusivamente na metilação do DNA.

1.3.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma alteração epigenética que consiste na modificação covalente resultante da atividade de uma família de enzimas denominadas metil-transferases (DNMT) que catalisam a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para um resíduo de citosina que antecede uma guanina – dinucleotídeo CpG (Sthathdee & Brown, 2002). Portanto, os resíduos de citosina numa fita recém-sintetizada são metilados pela enzima DNA-citosina metiltransferase I, a qual transfere o grupamento metila do doador S-adenosilmetionina para a fita nascente, de modo que o padrão de metilação seja mantido a cada divisão celular, conforme mostra a figura 5.

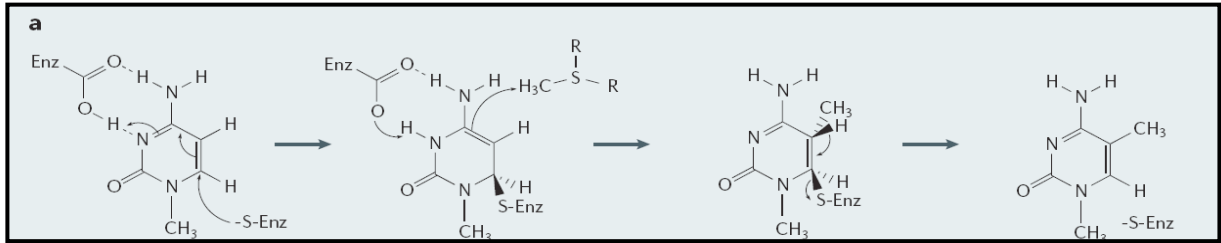


Figura 5: Metilação na posição 5 do anel de citosina. Durante este processo, a DNA metiltransferase transfere um grupamento metil da S-adenosilmetionina para o C5 do resíduo de citosina no DNA (Adaptado de Yoo *et al.*, 2006).

Uma ilha CpG é definida como uma região de DNA, maior que 200pb e com um conteúdo de bases GC acima de 0,5 (Li & Dahiya, 2002). Estima-se que o genoma humano apresenta aproximadamente 29.000 ilhas CpG (Nephew & Huang, 2003), estando 50-60% destas localizadas próximas à região promotora de genes ativos, podendo também se estender para dentro do primeiro exon (Jones & Baylin, 2002). Além disso, os dinucleotídeos CpG estão presentes em uma frequência de 5 a 10% e 70 a 80% desses nucleotídeos estão metilados e localizados em regiões não codificadoras (Verma & Srivastava, 2002).

A importância fundamental das ilhas CpG dentro dos promotores está associada com a repressão transcricional dos genes (Sthathdee & Brown, 2002). Este método de controle de expressão do gene é amplamente utilizado em todo o genoma. Ele está envolvido na regulação gênica durante a diferenciação e desenvolvimento, inativação do cromossomo X nas mulheres, criação e manutenção de genes *imprinted* e do silenciamento de elementos transponíveis (Esteller & Herman, 2002). No entanto, nem todos os genes apresentam ilhas CpG em suas regiões promotoras e por isso não podem ser silenciado por metilação (Costello *et al.*, 2000).

A hipermetilação parece ser um evento precoce na tumorigênese (Jones & Baylin, 2002; Widschwendter & Jones, 2002; Fackler *et al.*, 2004), e ocorre pelo menos tão frequentemente como mutações genéticas em células somáticas de forma que centenas de genes podem ser inativados por metilação do DNA em um único câncer (Jones & Baylin, 2002; Esteller, 2007).

As ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras de genes supressores de tumor normalmente encontram-se hipometiladas, a fim de serem expressos quando recrutados. Entretanto, em algumas células tumorais as ilhas CpG podem se apresentar hipermetiladas acarretando no silenciamento gênico, como ilustra a figura 6.

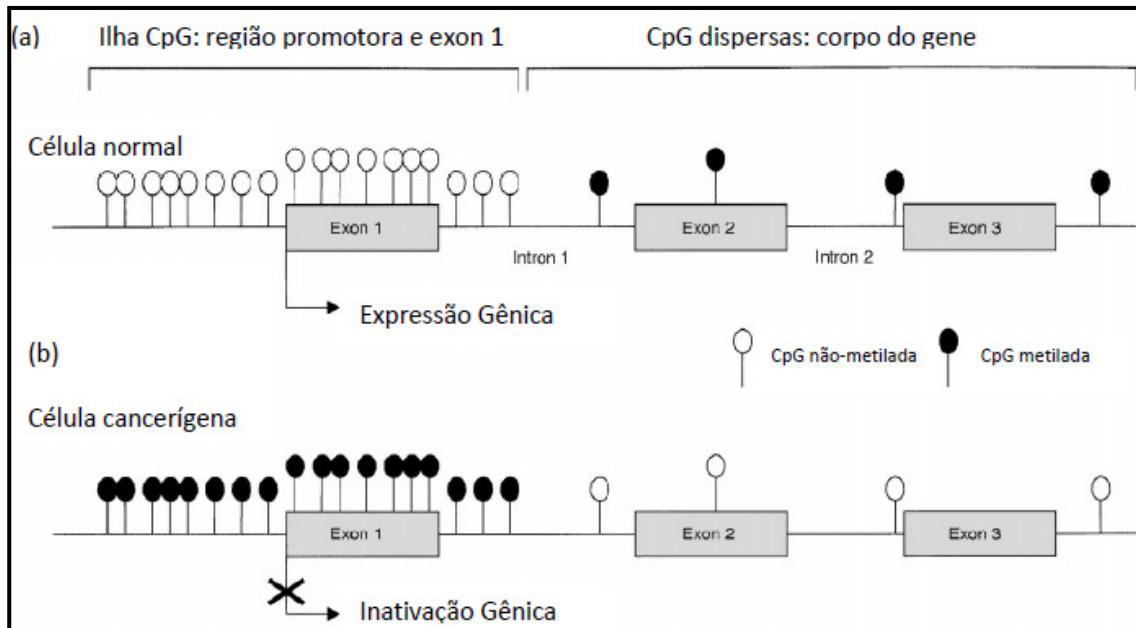


Figura 6: Inativação da transcrição gênica devido a hipermetilação da região promotora em célula tumoral (Adaptado de Esteller, 2000).

No caso dos genes supressores de tumor, o silenciamento através da hipermetilação do promotor é conhecido por ser um evento comum na tumorigênese, para proporcionar uma vantagem seletiva ao crescimento de células tumorais e contribuir para a instabilidade genética global do tumor (Jovanovic *et al.*, 2010). Apesar disso, não são todos os genes supressores de tumor, nas formações tumorais, silenciados epigeneticamente, devido à existência de uma especificidade aparente que leva em consideração o tecido de origem do tumor e o gene a ser silenciado (Costello *et al.*, 2000).

Um grande número de estudos em câncer de mama foram realizados mostrando a frequente metilação dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular: p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p15, CCDN2, DAPK; reparo do DNA: MGMT, hMLH1; transformação: GSTP1, transdução de sinal: RAR β 2, APC, ER β e aderência e metástase: CDH1, CDH13 (Jovanovic *et al.*, 2010). A alta frequência com que estas alterações ocorrem no câncer os torna potencialmente úteis como marcadores da doença.

Estudos mostraram que os eventos de alteração do estado de metilação ocorrem no início do desenvolvimento do câncer de mama, e são detectáveis em tecidos de CDIS (Lehmann *et al.*, 2002; Fackler *et al.*, 2004) e câncer de mama em estágio inicial (estádios 0 e I) (Dulaimi *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2009). Mas, para que a metilação seja considerada um marcador efetivo, os painéis de genes devem incluir os genes que são metilados especificamente no câncer e não no tecido normal, situação que ainda se encontra

em discussão devido ao estabelecimento do tecido verdadeiramente normal (Brooks *et al.*, 2009).

1.4 Gene supressor de tumor *TP53* (191170-OMIM)

O *TP53* é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 17, na posição 17p13.1 (Isobe *et al.*, 1986), apresenta 19 Kb e contém 11 exons. Desses, apenas o primeiro exon não é transcrito (Reisman *et al.*, 1988) (Figura 7).

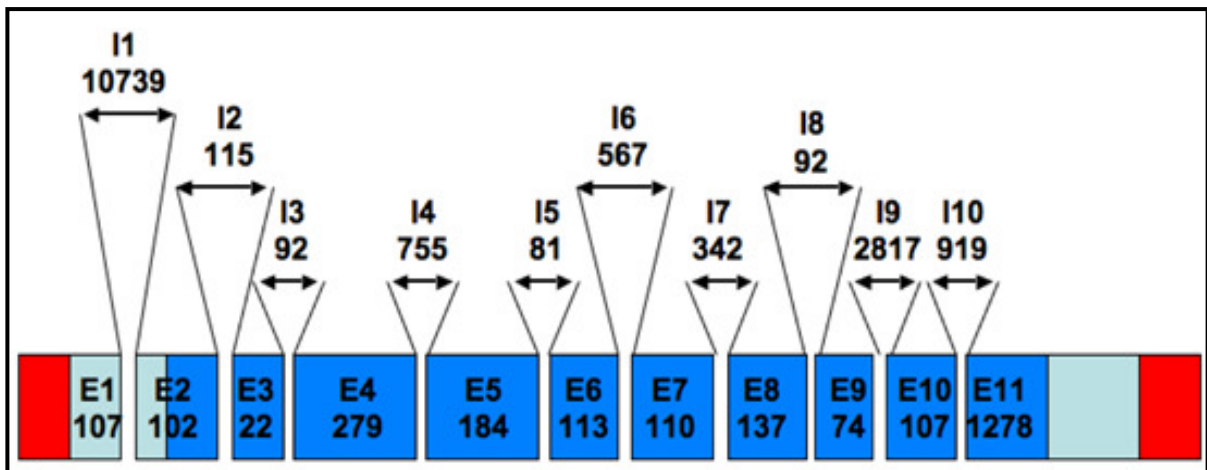


Figura 7: Esquema da estrutura do gene *TP53* humano: 11 exons (E) e 10 introns (I).

Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear, a p53, que foi descoberta em 1979 como uma proteína celular associada com a proteína transformante do vírus SV40, T-Ag (Lane & Crawford, 1979). Ela contém 393 aminoácidos, e seu tamanho é de 53 kDa. Possui cinco domínios estruturais e funcionais: uma região ácida N-terminal com um domínio de transativação bipartido (resíduos 20-40 e 40-60), um domínio regulatório rico em prolina (resíduos 60-90) exercendo uma função na apoptose, um domínio de ligação ao DNA sequência-específica (resíduos 100-300), um domínio de oligomerização (resíduos 325-355) e um domínio básico C-terminal que possui propriedades de ligação não específica aos ácidos nucleicos, facilitando a movimentação linear da p53 no DNA alvo (Zupnick & Prives, 2006) (Figura 8). Nesta região, também se encontra o sinal responsável pela exportação e localização da p53 no núcleo (Shu *et al.*, 2007).

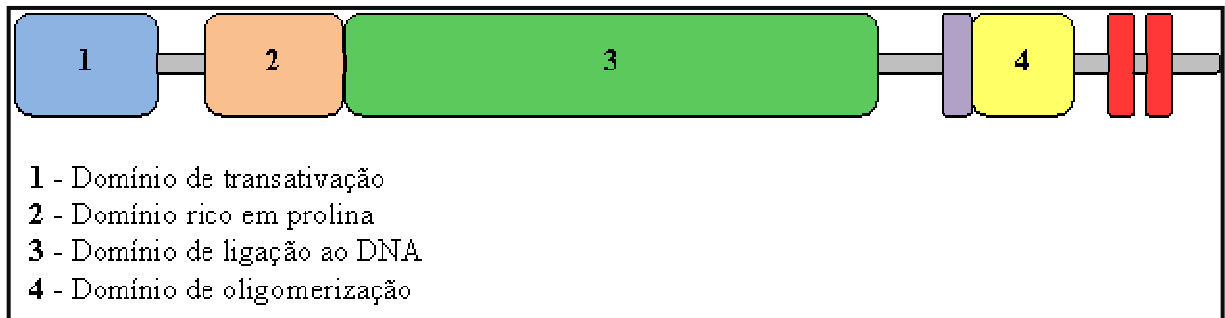


Figura 8: Os domínios funcionais da p53.

A ativação da p53 acontece por estresse celular, como danos ao DNA e estresse oncogênico (Stiewe, 2007). Em sua funcionalidade normal, esta proteína atua como fator de transcrição, ligando-se pelo seu domínio central à sequências específicas do DNA (El-Deiry *et al.*, 1992; Bourdon *et al.*, 1997). Assim, dependendo de fatores reguladores, ela pode suprimir o crescimento de células geneticamente defeituosas através do controle do ciclo celular, induzir a apoptose ou morte celular programada, reparar o DNA lesado, manter a vigilância ao DNA íntegro e ainda participar do reconhecimento de danos na ubiquitinação (Vousden & Lane, 2007).

A resposta ao estresse celular é complexa, e envolve os processos de reconhecimento dos sinais de estresse e reparação das lesões. Portanto, mutações ou alterações na expressão de proteínas envolvidas neste processo predispõem à instabilidade genômica, ao câncer e outras patologias (Kops *et al.*, 2005).

Mutações no gene *TP53*, além de impedir a formação correta do tetrâmero, podem ocasionar um aumento da meia vida da proteína, sua migração para o citoplasma e impedimento de ligação ao DNA. Células que apresentam essas mutações perdem a função supressora de tumor da proteína p53, no entanto ainda há outras vias de proteção contra a formação tumoral, existindo outras proteínas com ação contra o estresse oncogênico (Petitjean *et al.*, 2007; Vousden & Lane, 2007).

Diferentemente de outros genes supressores de tumor, que são inativados por mutação do tipo deleções de porção do gene ou inserção de nucleotídeos (*nonsense*), as mutações no gene *TP53* ocorrem por troca de um nucleotídeo (*missense*), em mais de 90% dos casos. Mais de 20.000 mutações no gene p53 estão registradas no IARC (International Agency for Research on Cancer) (Hussain *et al.*, 2006). Como resultado, a proteína pode ter sua conformação alterada, aumentando sua estabilidade e permitindo seu acúmulo nas células tumorais. As substituições de nucleotídeo também podem gerar códon de parada da leitura

do RNAm (*stop codon*), traduzindo uma proteína truncada (Harris *et al.*, 1997; Hollstein & Hainaut, 2010).

Embora as mutações no gene *TP53* causadoras de tumor tenham sido observadas principalmente em células somáticas, a que ocorre em células germinativas é responsável pela síndrome de *Li-Fraumeni* (SLF). Esta síndrome rara é transmitida de modo autossômico dominante, caracterizando-se pela predisposição a carcinomas de mama e cólon, tecidos moles, sarcomas, osteossarcomas, tumores cerebrais, leucemias e carcinomas adrenocorticais. Estes tumores em geral se desenvolvem em membros jovens da família com a síndrome SLF (Thompson *et al.*, 1995). Em síntese, a inativação da proteína p53 por mutação pode levar ao aumento da proliferação, instabilidade genômica e perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular.

Atualmente, mutações no gene *TP53* são detectadas em mais de 53 tipos diferentes de tumores incluindo os de cólon, bexiga, cérebro, mama, cérvix, esôfago, laringe, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, próstata, pele, estômago e tireóide.

As alterações descritas em *TP53* constituem as anormalidades moleculares mais frequentes nos tumores sólidos do homem, por isso apresenta um grande impacto clínico (Vousden & Lane, 2007). Elas representam ainda um fator independente de mau prognóstico no câncer de mama (Silvestrini *et al.*, 1996, Bowen *et al.*, 2006).

A maioria das mutações no gene *TP53* em tumores são identificados na região dos exons 5, 6, 7 e 8 (Robles & Harris, 2010). Estudos correlacionando mutações no gene *TP53* e carcinomas mamários esporádicos mostram que aproximadamente 25% desses tumores apresentam mutação neste gene (Petitjean *et al.* 2007).

As alterações têm sido demonstradas em menos de 10% nas hiperplasias ductal atípicas, mas são muito mais frequentes nos carcinomas *in situ* e cânceres invasivos, e, portanto, estão associados ao progresso da doença (Eisenberg & Koifman, 2001). A mutação neste gene pode ser um evento inicial em DCIS, que por sua vez é indicado como precursor da doença invasiva.

Além das mutações pontuais, ocorrem LOH na região cromossômica de *TP53* em cerca de um terço dos casos de câncer de mama esporádico (Katsama *et al.*, 2000). A LOH pode ser considerada como uma propriedade típica dos genes supressores tumorais, que podem perder um dos alelos por microdeleção e no processo de progressão tumoral pode ter o outro alelo inativado por algum evento de microdeleção ou mesmo por mutação.

Já nas alterações epigenéticas, o promotor do gene *TP53* não apresenta uma região rica em CpG, não formando, assim, ilhas CpGs. Entretanto, uma pequena região no início do

promotor, de 85 pb, contém 16 dinucleotídeos CpG e esta região apresenta-se hipermetilada em diversos tipos tumorais (Hurt *et al.*, 2006).

2 OBJETIVO

Este trabalho faz parte de um estudo mais extenso para a caracterização molecular de tumores de mama esporádicos em mulheres residentes do Estado do Rio de Janeiro. Assim, pretendemos analisar o perfil genético (mutação) e epigenético (metilação de região promotora) de regiões do DNA relacionadas ao *TP53* de tumores impalpáveis, provenientes de biópsias de mulheres residentes do Estado do Rio de Janeiro.

2.1 Objetivos específicos:

- 2.1.1 Investigar possíveis mutações no gene supressor tumoral *TP53*.
- 2.1.2 Analisar o estado de metilação na região promotora do gene *TP53*.
- 2.1.3 Correlacionar às evidências moleculares com os dados clínicos.

3 METODOLOGIA

3.1 População de estudo

Para este estudo foram incluídos 34 pacientes do sexo feminino, recrutadas entre os anos de 2007 e 2010, e que apresentaram lesões impalpáveis de mama nas categorias III e IV, de acordo com a classificação BI-RADSTM, fora do período de tratamento. As pacientes são provenientes do Instituto Nacional de Câncer, unidade III (HCIII/INCA) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), ambos localizados no município do Rio de Janeiro. Além dessas, foram incluídas 10 amostras controle de indivíduo saudável, do sexo feminino.

Previamente a realização da obtenção das amostras, as pacientes selecionadas foram informadas sobre os objetivos do projeto e os atributos de sua participação através de entrevista pessoal. Após a garantia do caráter voluntário da participação obteve-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foi respondido um questionário pessoal. O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) dos Hospitais HCIII/INCA (109/07) e HUGG (195/96).

3.2 Obtenção de amostras

A obtenção das amostras biológicas obedeceu a todos os requisitos estipulados pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP).

As amostras foram obtidas de pacientes do sexo feminino, que foram submetidas a exame de biópsia excisional, core biópsia ou mamotomia de acordo com a rotina de investigação dos hospitais participantes. Destas pacientes são coletados sangue e tecido tumoral.

Devido à possibilidade de tumores de origens diferentes em uma mesma mama ou da bilateralidade, os fragmentos foram qualificados como diferentes quando oriundos de: (1) pacientes diferentes; ou (2) mesma paciente com tumor bilateral e apresentando diferente classificação do tumor de acordo com o laudo histopatológico; (3) ou mesma paciente com mais de uma lesão não-associada em mesma mama e apresentando diferente classificação do tumor de acordo com o laudo histopatológico.

As amostras de sangue (4 ml) foram coletadas em tubo vacutainer com EDTA e armazenadas em temperatura ambiente, até a extração do DNA. Já as amostras de tecido mamário (1-10cm) foram lavadas com água mili-Q para a remoção do excesso de sangue. As

amostras, então, foram imersas diretamente em 100-500 μ L de solução de digestão (NaCl 100 mM; Tris-Cl 10mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; SDS 0,5%), proteinase K (25mg/mL) e incubadas em gelo até a extração do DNA.

3.3 Extração de DNA genômico

3.3.1 Tecido

Devido ao tamanho da amostra que variava em poucos centímetros e por conter em sua maioria microcalcificações, adaptações foram necessárias à extração do DNA.

Os DNAs provenientes de biópsia foram extraídos a partir de 0,1 g de tecido fresco seguindo o método “fenol-clorofórmio”. As amostras teciduais, já imersas em solução de digestão (NaCl 100 mM; Tris-Cl 10mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; SDS 0,5%; proteinase K (25mg/mL), foram maceradas com auxílio de pistão plástico.

Continuando o processo de extração acrescentou-se 10 μ L de proteinase K (25mg/mL) aos tubos que foram incubados posteriormente durante 12 horas à 57°C. Em seguida, os tubos de 1,5 mL foram centrifugados em microcentrífuga à 16.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL, e adicionou-se uma mistura de fenol[®] (SIGMA) (Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamil na proporção 25:24:1, saturado com TRIS-Cl 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM) em quantidade (volume) igual a amostra digerida no tubo. Os tubos foram centrifugados na microcentrífuga a 4.000 rpm por 10 minutos. Três fases foram observadas, e a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Neste momento, adicionou-se acetato de amônio 8M e etanol PA nas quantidades de 0,1X e 2X o volume da amostra, respectivamente, a fim de precipitar o DNA. A mistura foi incubada a -20° C por 12 horas. No dia seguinte, após uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 50 μ L de água mili-Q.

3.3.2 Tecido - purificação

Quando a amostra apresentava uma quantidade visível de microcalcificações na coleta, ela era submetida a um procedimento extra. A amostra foi transferida para um tubo 1,5 mL limpo e adicionado um volume de EDTA 5M, de maneira que a cobrisse totalmente. Depois o tubo com a amostra foi aquecido em banho-maria à 55°C, até que as partículas de cálcio

estivessem totalmente dissolvidas, a fim de que não interferisse na reações de PCR.

3.3.3 Sangue

Uma amostra de 4ml de sangue (armazenados em tubo com anti-coagulante EDTA) foi transferida para um tubo de 15mL e centrifugada a temperatura ambiente por 10 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante (plasma) foi desprezado e ao restante foram adicionados 10 mL de solução de lise de hemácias (TRIS-Cl 10mM; MgCl₂ 5mM; NaCl 10mM) gelada. O tubo foi agitado vigorosamente e mantido em gelo durante 30 minutos. Depois, a mistura foi centrifugada em microcentrífuga por 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as etapas descritas anteriormente, de adição da solução de lise de hemácias até a última centrifugação, foram repetidas até que o precipitado se apresentou esbranquiçado.

Assim que o concentrado estava adequado, foi ressuspendido em 600µL de solução de lise de núcleos (TRIS-Cl 10mM; EDTA 2mM; NaCl 400mM), 15µL de SDS 20% e 1,5µL de proteinase K (25mg/mL). A mistura foi mantida a 37°C por 16h.

No dia seguinte, foi adicionado o mesmo volume da amostra em mistura de fenol[®] (SIGMA) (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamil na proporção 25:24:1, saturado com TRIS-Cl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 3000 rpm. A fase de cima, que contém o DNA, foi transferida para um novo microtubo. O DNA foi precipitado adicionando 0,1X o volume com acetato de amônio 8M, 2X o volume com etanol PA e incubado a -20°C durante a noite. Depois o tubo foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 50µL de água mili-Q.

3.4 Eletroforese de DNA genômico

Após a extração, a presença e a integridade do DNA foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/µl). A corrida eletroforética foi realizada com o tampão TAE 1X (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 1M; EDTA 50 mM, pH 8,0) a 80 V durante 40 minutos. Foi aplicada no gel uma mistura de 1µl de DNA e 5 µl de tampão de carregamento 6X (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; azul de cianol 0,1%; ficoll 400, 5%). Após a corrida, o gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação, utilizando luz ultravioleta.

3.5 Investigação de possível mutação no gene supressor tumoral *TP53*

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificar os exons 5, 6 e 7, foram utilizadas na solução base 59 μL de água ultra-pura e estéril; 20 μL de tampão STR® 10X (Promega); 8 μL de dNTPs® (2 mM) (Invitrogen); 6 μL de MgCl_2 ® (50 mM) (Promega); 3,0 μL de cada iniciador concentrados a 10 pmol/ μL (Tabela 4); 1 μL da enzima DNA polimerase® (1 U/ μL) (Promega) e 50- 100ng/ μL de DNA genômico. Sendo o volume final de 100 μL .

No termociclador Veriti (Applied Biosystems), a amplificação dos fragmentos foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 2 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para a amplificação do exon 8 foram utilizadas as mesmas reação e ciclagem, tendo por única diferença a temperatura de anelamento que passou a ser 55°C.

Tabela 4: Sequências dos iniciadores dos exons do gene *TP53* utilizados no projeto. *O iniciador para os exon 5 do gene *TP53* foram desenhados a partir das sequências disponíveis no GeneBank (código de acesso X54156).

Exon	Denominação e Sequência dos Iniciadores	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
5	5F - AGTACTCCCCTGCCCTCAA 5R - ACCATCGCTATCTGAGCAG	190	*
6	6F - CACTGATTGCTCTTAGGTCT 6R - GTTGCAAACCAGACCTCAG	144	Zhou <i>et al.</i> , 2009
7	7F - TAGGTTGGCTCTGACTGTA 7R - GACCTGGAGTCTTCCAGTG	118	Zhou <i>et al.</i> , 2009
8	8F - CTCTCTTTTCCTATCCTGA 8R - TCTTGTCTGCTTGCT	180	Zhou <i>et al.</i> , 2009

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose do DNA amplificado

Para a verificação da eficiência da reação da PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 1M; EDTA 50 mM, pH 8,0) e corados com brometo de etídeo (0,5 µg/µl). Foram aplicados 8,0 µl do material amplificado juntamente com 2 µl de tampão de carregamento 6X (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; azul de cianol 0,1%; ficoll 400, 5%). Utilizou-se, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 100 pares de base (Gene Ruler® – Fermentas). A eletroforese foi realizada à 110 V por 1 hora e o gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação, com luz ultravioleta.

3.5.3 Purificação dos produtos de PCR

Para sequenciar os fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification* (GE).

Foram adicionados 500µL de tampão de captura® (GE) ao tubo com a fatia seccionada de gel de agarose contendo a banda específica do produto de PCR. A mistura foi agitada por inversão e dissolvida em banho-maria a 60°C. Posteriormente, a mistura foi transferida para um tubo com uma coluna de aderência a DNA e centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos. O excedente foi descartado, e 500 µL da solução de lavagem® (GE) com etanol absoluto (na proporção de 1:4) foram adicionados a coluna de aderência® (GE), que novamente foi levada a idêntica centrifugação. O excedente foi descartado e, para remover o excesso de etanol, outra centrifugação (13.000 rpm por 1 minuto) foi realizada. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL, no qual se adicionou 50µL de tampão de eluição® (GE) na coluna e foi incubado por 1 minuto em temperatura ambiente. Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 16.000 x g por 1 minuto. O produto purificado foi armazenado em freezer a -20°C.

3.5.4 Quantificação

A quantificação das amostras foi feita em duas ocasiões, uma após a extração do DNA e outra após a purificação do produto de PCR. Em ambas utilizou-se a absorvância de 260 nm (para detectar ácidos nucleicos) e 280 nm (para detectar proteínas). A razão entre as

duas absorvâncias, A260 e A280, deveria ser igual ou maior a 1,7 para que o material fosse considerado puro (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras de DNA (independente da origem) foram quantificadas através do espectrofotômetro Beckman Nanodrop (DU 640).

3.5.5 Sequenciamento automático

O sequenciamento de DNA foi realizado com o método de terminação em cadeia, o qual utilizou o dideoxynucleotídeo.

Na reação de sequenciamento de fragmentos foram utilizados 10 a 20 ng de produto de PCR, água ultra pura deionizada e 1,0 µL do iniciador específico (4,0 pmol/µL), perfazendo um volume final de 7,5µL em placa de 96 poços. Depois, foram adicionados 1,5 µL de tampão® 5x (fornecido em conjunto com o “Big Dye”) (Applied Biosystems); e 1 µL do kit *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing v3.1* (Applied Biosystems).

Esta reação foi realizada em termociclador com 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a PCR foi feita a precipitação do DNA, iniciando com o acréscimo de 30µL de isopropanol 75% em cada poço da placa. A solução foi submetida ao vortex por 10 segundos e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos, sob abrigo da luz. Após esse período, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram adicionados 50 µL de etanol 75% e mais uma vez foi levada a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, o excesso de sobrenadante foi retirado e o conteúdo da placa foi seca em bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz.

A última etapa da preparação do produto a ser sequenciado é a desnaturação. Esse processo inicia com a adição de 10 µL de formamida Hi-di® (Applied Biosystems) em cada poço. A placa foi levada a bloco aquecido com temperatura de 95°C por 3 minutos e logo em seguida foi colocada em recipiente com gelo permanecendo por 10 minutos. Para finalizar, a placa foi levemente centrifugada e levada para o sequenciador 3130 *Genetic Analyzer®* (Applied Biosystems).

Para analisar as sequências das amostras, uma comparação foi feita entre uma sequência referência dos genes *TP53* (NC_000017-9 do GenBank utilizada pelo IARC) e a sequência das amostras geradas pelo sequenciamento. Essa comparação foi realizada através dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* desenvolvido por Hall *et al.*, (1990) e *Sequencher Demo Version®* (Gene Codes).

3.6 Métodos específicos para análise do estado de metilação do DNA na região promotora do gene *TP53*.

3.6.1 Modificação do DNA com bissulfito de sódio

O método de modificação do DNA através da reação com bissulfito de sódio foi utilizado para análise do estado de metilação de sequências na região promotora do gene *TP53*. Esse método consiste basicamente em desaminar o DNA genômico em condições nas quais as citosinas são convertidas em uracilas e as 5-metilcitosinas permanecem inalteradas. O método foi realizado segundo instruções do kit EPITECT® (Quiagen) para modificação do DNA com bissulfito de sódio.

Na reação de modificação, utilizamos 1000 ng de DNA genômico que foi ajustado para um volume final de 20µL com água livre de RNase em cada reação. Depois, 85 µL do Mix Bissulfito® (Quiagen) foram dissolvidos em 35 µL de tampão de proteção ao DNA® (Quiagen) que foram adicionados ao tubo, formando um volume final de 140 µL. A solução foi levemente homogeneizada e levada a termociclador Veriti (Applied Biosystems), onde sofreu três ciclos de desnaturação e incubação: desnaturação a 99 °C por 5 minutos e incubação a 60 °C por 25 minutos; desnaturação a 99 °C por 5 minutos e incubação a 60 °C por 85 minutos; desnaturação a 99°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 175 minutos. Terminada a incubação do DNA, todo o conteúdo da reação foi transferido para um tubo de 1,5 mL e foi adicionado 560 µL de tampão BL® (Quiagen). A mistura foi transferida para a coluna de purificação do kit posicionada sobre um tubo coletor, com posterior centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o material depositado no tubo coletor foi descartado e o DNA, agora fixado na membrana da coluna, foi “lavado” com a adição de 500 µL de tampão BW® (Quiagen). Nova centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm foi realizada e o material depositado no tubo coletor foi descartado.

Posteriormente, foi adicionado à coluna 500 µL do tampão BD® (Quiagen), responsável pela dessulfonação alcaliana, e desenvolveu-se uma incubação do DNA por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi levado a centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm e o volume depositado no tubo coletor foi descartado.

Adicionou-se, à coluna, 500 µL de tampão BW® (Quiagen) para retirada de sal do material modificado. Novamente, o material foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm e, o material depositado no tubo coletor foi descartado. Este processo de lavagem do DNA foi repetido e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. Nova centrifugação, agora por 4

minutos a 14.000 rpm, foi realizada para retirada de resquícios de reagente que poderiam estar presentes na membrana. O material depositado no tubo coletor ao fim da centrifugação foi descartado. Para eluir o DNA, adicionou-se 20 µL de tampão EB® (Quiagen) no centro da membrana e nova centrifugação foi realizada, a 12.000 rpm, por 1 minuto. O DNA modificado permaneceu armazenado a -20°C.

3.6.2. Reação em cadeia da polimerase (MSP – Methylation Specific PCR)

Após a modificação do DNA com bissulfito de sódio, as sequências de DNA metilado e não metilado se tornam distintas. A técnica do MSP baseia-se nas diferenças entre as sequências após este tratamento, pois as citosinas não metiladas transformam-se em uracila. Duas reações de PCR são realizadas para cada amostra de DNA: em uma reação, são utilizados iniciadores específicos para detectar DNA metilado e na outra reação utilizam-se iniciadores específicos para detectar DNA não metilado.

Para verificar o estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, analisamos uma sequência de DNA localizada entre os nucleotídeos 702 e 950 deste gene (código de acesso no GeneBank: X54156). Dentro desta região há uma sequência com 85 pares de base essencial para a atividade máxima deste promotor (Bienz-Tadmor *et al.*, 1985). Os iniciadores utilizados para a técnica MSP estão listados na tabela 5.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores para amplificação de parte da região promotora do gene supressor de tumor *TP53* na técnica MSP.

Iniciador	Sequência do iniciador (5'-3')	Amplicon	Temperatura de anelamento (°C)	Referência	
<i>TP53</i> metilado	TTCGGTAGGCGGATTATTTG AAATATCCCCGAAACCCAAC	F R	193 pb	60	Amatya <i>et al.</i> , 2005
<i>TP53</i> não - metilado	TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT CCAATCCAAAAAACATATCAC	F R	247 pb	59	Amatya <i>et al.</i> , 2005

As reações da PCR foram realizadas com aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada iniciador, 2 mM de dNTPs® (Fermentas), 1 U da enzima Taq Platinum®

(Invitrogen), 2,5 µl do tampão 10X® (Invitrogen) e 2,5 mM MgCl₂® (Invitrogen) em volume final de 25 µl. O programa da PCR consistiu em primeira desnaturação à 95°C por 7 minutos, seguida por 40 ciclos à 95°C por 45 segundos, 58°C (para iniciadores específicos para DNA não-metilado) e 60°C (para iniciadores específicos para DNA metilado) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada à 72°C por 5 minutos. As reações da PCR foram realizadas em termocicladores GeneAmp (Applied Biosystems).

Para o controle positivo da presença de metilação, realizamos a reação de metilação *in vitro* com a enzima metiltransferase *SssI*® (New England Biolabs) em DNA extraído de sangue periférico de indivíduo saudável. A reação foi realizada em volume final de 20 µl, contendo 2 µg de DNA genômico, 2 µl de tampão 10X NE-I® (New England Biolabs), 320 µM S-adenosil metionina® (New England Biolabs) e 8 U da enzima metiltransferase *SssI*® (New England Biolabs). A reação foi incubada à 37 °C por 60 minutos e inativada à 65 °C por 20 minutos. A avaliação da hipermetilação no DNA genômico, pela enzima metiltransferase *SssI*, foi verificada através da incapacidade de digestão do DNA pela enzima de restrição *BstUI*® (New England Biolabs). Esta enzima reconhece o sítio CGCG e não o cliva na presença de citosina metilada. Após o tratamento com a enzima *SssI*, foram adicionados 3 µl de tampão 10X NE-II® (New England Biolabs) e 20 U da enzima *BstUI*® (New England Biolabs). A reação foi incubada à 60 °C por 2 horas. O mesmo DNA extraído de sangue periférico, não metilado *in vitro*, foi utilizado como controle negativo da presença de metilação na reação da PCR.

3.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida vertical 8% não-desnaturante

Os produtos da PCR (MSP) foram analisados por meio de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8% não-desnaturante (2 ml de bis-acrilamida 40%; 1 ml TBE 10X; 0,9 M Tris-base; 0,9 M ácido bórico; 20 mM EDTA pH 8,0; 100µl de persulfato de amônio 10%; 8 µl TEMED). O gel foi vertido entre duas placas, uma de 12 cm e outra de 14 cm, com espaçamento de 1,5 mm. O gel foi mantido à temperatura ambiente, para polimerização, por no mínimo 15 minutos.

O volume de 15 µL das amostras provenientes da PCR foi misturado a 2 µL do tampão de carregamento 6X (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; azul de cianol 0,1%; ficoll 400, 5%) e aplicado nos poços formados pelo pente. A eletroforese foi realizada por 60 minutos a 200 V, 70 mA e 50W com tampão TBE 0,5X. Utilizou-se, como

referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 100 pares de base (Gene Ruler® – Fermentas).

3.6.4 Detecção do material amplificado por coloração com nitrato de prata

O par de placas contendo o gel de poliacrilamida 8% foi aberto com a ajuda de uma espátula. O gel foi colocado em uma bandeja contendo solução fixadora (20 ml de etanol absoluto; 1,5 ml de ácido acético PA; em volume final de 100 ml de água destilada). O gel foi mantido nesta solução, com agitação, por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 ml de solução de nitrato de prata 10% e o gel foi incubado com agitação, por mais 30 minutos. Subsequentemente, o gel foi lavado em água destilada, por 10 segundos, e os produtos de amplificação revelados pela adição de solução de revelação (30 g de NaOH, em volume final de 1000 ml de água destilada). Adicionar 2 ml de formaldeído (37%) quando a solução estiver em contato com o gel em agitação constante. O gel permaneceu nesta solução até que os produtos de amplificação estivessem definidos (aproximadamente 5 minutos). Para interromper a reação, adicionou-se a solução fixadora.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil clínico das pacientes

Trinta e quatro pacientes do sexo feminino foram incluídas no trabalho. Elas apresentaram algum tipo de alteração mamária impalpável sugestiva de câncer, com caracterização BIRADSTM mamográfica 3 ou 4. Suas idades variaram de 30 – 80 anos com média 54,52 e desvio padrão 14. A faixa etária de maior número de pacientes foi de 41 a 50 anos, igualando ao período em que as mulheres sofrem uma grande alteração hormonal devido à entrada da menopausa, estágio onde mais de 50% se encontravam. Estes e os outros dados clínicos das pacientes podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6: Características sócio-demográficas e clínicas das pacientes (n = 34).

Fatores	n (%)
Idade (anos)	
30 – 40	4 (11,76)
41 – 50	13 (38,24)
51 – 60	6 (17,65)
61 – 70	6 (17,65)
< 70	5 (14,71)
Cor da pele*	
Branca	13 (38,24)
Não branca	21 (61,76)
Idade da Menarca (anos)	
< 12	6 (17,65)
≥ 12	26 (76,47)
NI ¹	2 (5,88)
Menopausa	
Pré-menopausa	15 (47,2)
Pós-Menopausa	18 (52,94)

Fatores	n (%)
Número de Filhos	
Nenhum	7 (20,59)
1	6 (17,65)
2	10 (29,41)
3	2 (5,88)
4 ou mais	6 (17,65)
NI ¹	3 (8,82)
Abortos	
Nenhum	20 (58,82)
1	4 (11,76)
2 ou mais	7 (20,59)
NI ¹	3 (8,82)
Histórico familiar de câncer de mama**	
Não	22 (64,71)
Sim	12 (35,29)

Legenda: ¹ NI: não-informado. *A cor da pele das pacientes é auto-declarada.** O histórico familiar de câncer de mama não foi baseado em informações de mutação nos genes BRCA 1 ou BRCA 2.

Dezessete pacientes apresentaram hipertensão arterial sistêmica (HAS) como doença crônica. Entre as 17 pacientes, 14 se encontravam no período de pós-menopausa, e 10 possuem mais de 55 anos.

Seis pacientes apresentaram lesões benignas e 20 pacientes apresentaram tumor maligno (tabela 7). Entre os tumores benignos, 5 eram do tipo fibroadenoma. Já os carcinomas, incluíam: 13 do tipo ductal infiltrante puro, 3 do tipo ductal infiltrante com componente de carcinoma ductal *in situ* associado, 2 carcinomas ductais *in situ* puros, 1 carcinoma mucinoso puro e 1 carcinoma mucinoso com carcinoma ductal *in situ* associado.

O exame de biópsia é, normalmente, indicado após o exame radiológico de imagem. Nas pacientes incluídas no estudo, foi realizado o exame de mamografia, no qual apresentaram as categorias BIRADSTM descritas na tabela 7. As lesões mamárias das

pacientes que apresentaram o tumor maligno no laudo histopatológico foram caracterizadas como 4B ou 4C BIRADSTM na mamografia realizada anteriormente.

Apenas 2/34 pacientes que apresentaram um laudo histológico de carcinoma possuíam histórico de câncer de mama em parente de 1º grau.

Tabela 7: Aspectos radiológicos das pacientes e características histopatológicas dos tumores de mama (n= 34).

Fatores	n (%)
Subtipo Histológico	
CDI ²	16 (47,06)
Não CDI ²	4 (11,77)
Lesão Benigna	6 (17,65)
ND ³	4 (11,77)
NI ¹	4 (11,77)
Receptor de Estrogênio	
Positivo	14 (41,18)
Negativo	4 (11,76)
NI ¹	16 (47,06)
Receptor de Progesterona	
Positivo	11 (32,35)
Negativo	7 (20,59)
NI ¹	16 (47,06)
HER2	
Positivo	3 (8,82)
Negativo	11 (32,35)
NI ¹	20 (58,82)

Fatores	n (%)
Categoria BI-RADS™	
3	8 (23,53)
4A	1 (2,94)
4B	15 (44,11)
4C	10 (29,41)
Microcalcificação	
Presente	14 (41,17)
Ausente	11 (32,35)
NI ¹	9 (26,47)

Legenda: ¹ NI: não-informado; ² CDI: carcinoma ductal infiltrante; ³ ND: não determinado - inclui falta de material necessário para conclusão do histopatológico ou a ausência de tumores benignos e malignos no tecido mamário avaliado.

4.2 Análise da sequência dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*

A análise da sequência, através da técnica de sequenciamento automático, teve por objetivo a busca de mutações no gene *TP53*.

Em nosso estudo, foram analisadas 34 amostras de DNA de células provenientes de fragmento de biópsia de lesão de mama. Nessas amostras não foram observadas nenhum tipo de mutação. Na figura 9, está ilustrado um eletroferograma, produzido pelo *software Bioedit Sequence Alignment Editor*, desenvolvido por Hall *et al.*, (1990), representativo do sequenciamento dos exons 5, 6, 7 e 8 de uma das amostras estudadas.

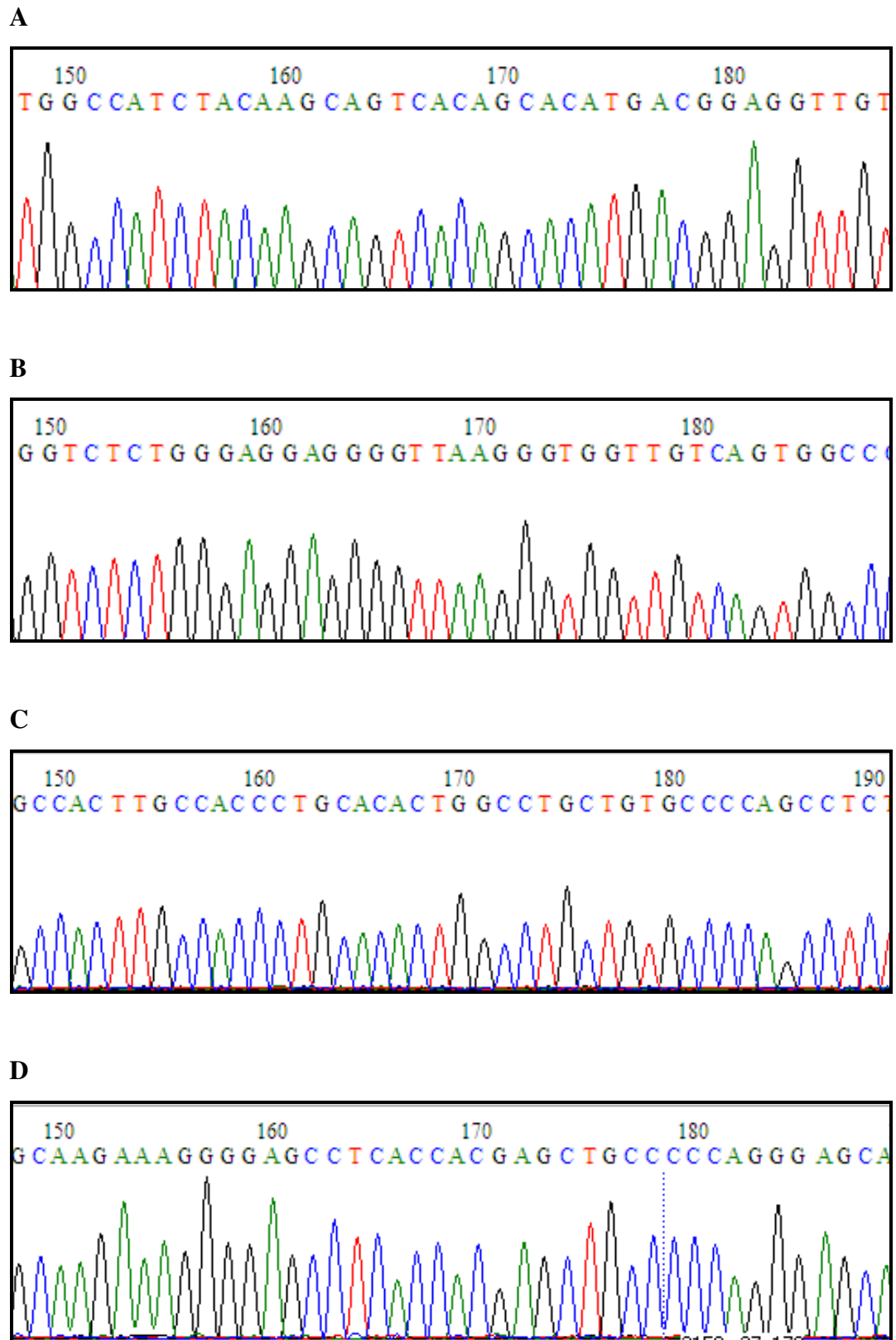


Figura 9: Análise do sequenciamento de DNA dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*. Eletroferogramas representativo da ausência de mutação de a partir de uma amostra de tumor. A: exon 5; B: exon 6; C: exon 7; D: exon 8.

4.3 Análise do perfil de metilação da região promotora do gene *TP53*

A fim de determinarmos o perfil de metilação na região promotora do gene *TP53*, foram analisadas 30 pares de amostras de DNA de células de sangue periférico (controle normal) e amostras de DNA de células de tecido provenientes de biópsia de pacientes com suspeita de câncer de mama esporádico (tecido tumoral). Quatro amostras do total coletado não puderam ser utilizadas devido à baixa concentração de DNA que continham.

Nenhuma das amostras tumorais analisadas apresentou alteração no estado da metilação em relação às amostras normais, conforme mostra o exemplo da figura 10. Só foi verificada amplificação nas reações da PCR contendo os iniciadores específicos para o DNA não-metilado.

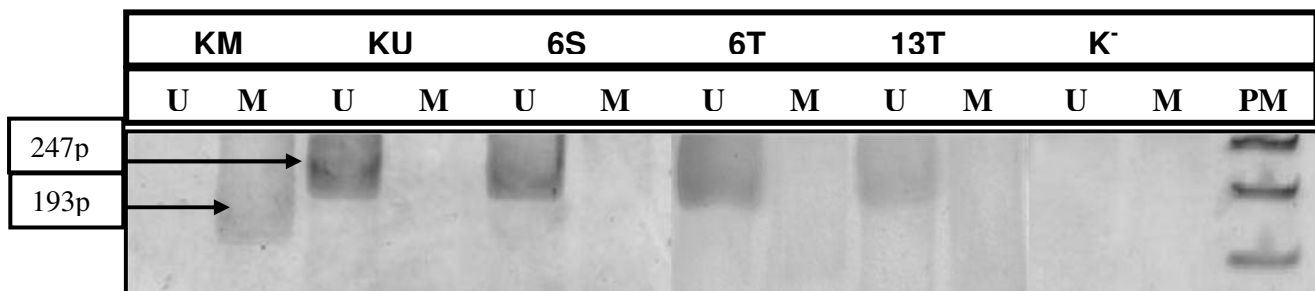


Figura 10: Análise do perfil de metilação da região promotora do gene *TP53*. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. U: reação com primers desenhados para fita de DNA não-metilada; M: reação com primers desenhados para fita de DNA hipermetilada; KM: controle da reação com primers desenhados para fita de DNA metilada; KU: controle da reação com primers desenhados para fita de DNA não-metilada; K⁻: controle negativo das reações; PM: padrão de peso molecular; 6S: amostra de sangue 6 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*; 6T: amostra tumoral 6 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*. 13T: amostra tumoral 13 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*. As setas indicam os produtos de PCR para as reações contendo DNA hipermetilado (193 pb) e hipometilado (247 pb).

5 DISCUSSÃO

5.1 Perfil clínico das pacientes

No presente trabalho, buscamos uma caracterização molecular de lesões tipo 3 e 4, de acordo com a categoria BI-RADS™. Para tal, iniciamos investigando em torno de um gene altamente informativo para o câncer de mama avançado, o *TP53*. No entanto, encontramos algumas dificuldades inerentes ao número de pacientes, falta de dados clínicos e às características das amostras de tecido que precisaram passar por um intenso processo de purificação e padronização.

O câncer de mama, apesar das novas estratégias terapêuticas e diagnósticas, continua sendo um desafio para a Saúde Pública. Corresponde ao segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres (MS, 2009).

Os problemas sócio-econômicos e culturais do Brasil certamente são fortes influenciadores das elevadas taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama. A maioria das pacientes que buscam os serviços públicos de saúde e são diagnosticadas, apresentam tumores em estágios clínicos avançados. Mulheres que são diagnosticadas numa fase precoce da doença têm um prognóstico melhor e requerem tratamentos menos severos que aquelas diagnosticadas em fase avançada (Etzioni *et al.*, 2003).

Uma das principais dificuldades encontradas em nosso trabalho foi o pequeno número de amostras, que após três anos de coleta foi de 34. Apesar dos esforços de toda a equipe, a grande maioria das pacientes atendidas correspondia a estágios clínicos mais avançados. Além disso, quando possuíam lesão nas categorias BI-RADS™ 3 ou 4, pertenciam ao grupo das lesões palpáveis. Esse fato demonstra que as pacientes são diagnosticadas, geralmente, em estágios clínicos mais avançados. É, portanto, fundamental que haja mecanismos, pelos quais indivíduos encontrem uma rede de serviços quantitativa e qualitativamente capaz de suprir essa necessidade, em todo o território nacional.

Outra dificuldade, encontrada em nosso estudo, foi o baixo número de dados dos exames de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e HER-2, realizados pelo sistema de saúde público. Os testes para expressão dos receptores de progesterona e estrogênio foram realizados em 52,94% das pacientes. O teste de expressão da proteína HER-2 foi realizado em 41,18% das pacientes. A avaliação desses receptores, para estudo da progressão da doença e conduta no tratamento, devido à variedade de respostas, é fundamental. No entanto, pode-se

constatar que, de forma geral, não é uma realidade presente no sistema de saúde público brasileiro.

A prevenção do câncer de mama ainda não é totalmente possível devido, principalmente, à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Afinal, nenhum desses fatores associados foi capaz de promover uma prevenção eficaz.

Hoje, o câncer de mama é um dos tipos de câncer mais estudados em todo o mundo. No entanto, as diversas ferramentas diagnósticas utilizadas ainda não são suficientes para se alcançar uma detecção precoce e medida conservadora. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias têm sido estudadas e, até o momento, apenas a mamografia para mulheres com idade entre 50 e 69 anos é recomendada como método efetivo para detecção precoce.

Além das dificuldades inerentes ao tumor, deve-se levar em consideração a capacidade diagnóstica dos métodos utilizados na rotina, como a detecção radiológica. O rastreamento através do exame mamográfico tem sido mostrado como eficaz na redução da mortalidade por câncer de mama em mulheres com idade superior a 50 anos, mas é até 50% menos sensível em mulheres jovens (Maskarinec *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, o maior número de pacientes se encontrava com idade acima dos 45 anos e das 34 pacientes que realizaram biópsia, 14 não apresentavam doença maligna. Esses resultados ratificam que a dificuldade de detecção pela mamografia em mulheres mais jovens pode levar a um diagnóstico tardio e, portanto, deficiente. Além disso, a utilização do rastreamento pela mamografia vem sendo acompanhada da realização de grande número de biópsias desnecessárias, uma vez que em considerável parte das lesões suspeitas de malignidade por este método tem revelado tratar-se de doenças benignas. A cada duas mulheres que recebem mamografias anuais, uma deverá ter pelo menos um resultado falso-positivo em sua vida (Brooks *et al.*, 2009). O trabalho de Smith e colaboradores (2010) observou que dentre 1.000.000 de mulheres submetidas a biópsias mamárias anualmente nos Estados Unidos da América, em decorrência de achados mamográficos anormais diagnosticados nos programas de rastreamento, 700.000 a 850.000 apresentaram resultados negativos.

A evidência radiológica que mais nos chamou atenção nos resultados foi a alta presença de microcalcificações (41,8%) nas mamografias. A avaliação da calcificação nas lesões da mama é um dos principais critérios de avaliação para a mamografia da mama. A morfologia e distribuição da calcificação estão diretamente relacionados a histologia das

lesões. Estes são particularmente importantes para o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (Feig, 2000) e continua a ser o esteio de detecção de neoplasia maligna de mama não-palpáveis. Além disso, a análise das características das calcificações pode ajudar a prever o tamanho do tumor o grau, assim como a presença de invasão (Tse *et al.*, 2008).

Portanto, a série de limitações diagnósticas aponta para a necessidade da implementação de modalidades complementares, como a identificação de biomarcadores que poderiam proporcionar uma detecção mais precoce.

5.2 Mutação no gene supressor tumoral, TP53

O produto do gene *TP53*, a proteína p53, atua em várias vias controlando a proliferação celular, sobrevivência da célula e integridade genômica (Olivier *et al.*, 2006). Ela tem um papel importante na regulação da resposta da célula ao estresse, ativando ou desativando genes envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA normais. Uma vez mutado, o *TP53* pode expressar uma proteína, p53 mutante, incapaz de realizar suas funções (Petitjean *et al.*, 2007; Pfeifer & Besaratinia, 2009; Robles & Harris, 2010).

Muitos tipos diferentes de mutações são observados no *TP53*, incluindo todos os tipos de substituições de base possível. Mas, a maior ocorrência é a mutação do tipo missense com quase 90%, distribuídos ao longo da molécula, particularmente no domínio de ligação ao DNA (IARC, 2011). A ocorrência de mutações do gene *TP53*, não se limita a algumas sequências particulares ou códons ao longo deste. No entanto, a maioria engloba cinco a oito exons, e se estende por cerca de 180 códons ou 540 nucleotídeos (Pfeifer & Besaratinia, 2009; Robles & Harris, 2010). Além disso, cinco dos seis principais pontos de mutação no gene *TP53*, ou seja, códons 175, 245, 248, 273 e 282, contêm sequências de ilhas CpG metiladas ((IARC, 2011; Pfeifer & Besaratinia, 2009). Portanto, dinucleotídeos CpG são alvos importantes para mutações no gene.

Mutações somáticas, no gene *TP53*, constituem as alterações mais frequentes nos tumores sólidos do homem, tornando este gene, o alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico (Hainaut, 2000; Hurt *et al.*, 2006; Vousden & Lane, 2007). Já, as mutações germinativas no gene *TP53* são a causa subjacente da síndrome de Li-Fraumeni, que predispõe a um amplo espectro de tipos de câncer precoce (Olivier *et al.*, 2010). Além disso, *TP53* é altamente polimórfico em algumas regiões codificantes e não-codificantes, podendo contribuir com aumento de susceptibilidade ao câncer (Whibley *et al.*, 2010).

O sequenciamento de DNA é o padrão ouro para identificação de mutações do gene *TP53*. A maioria das mutações no gene *TP53*, em tumores, são identificados na região dos exons 5-8 (Robles & Harris, 2010). Estudos correlacionando mutações no gene *TP53* e carcinomas mamários esporádicos mostram que, aproximadamente 25% desses tumores, apresentam mutação neste gene (Petitjean *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram analisadas a presença de mutações nos exons 5, 6, 7 e 8 do *TP53* e como já foi exposto, nenhuma alteração foi encontrada nas 34 amostras estudadas. Esse dado pode estar relacionado ao tipo inicial de lesão, de acordo com os dados radiológicos das lesões de categorias 3 e 4 da escala BI-RADS™.

A ausência de mutação não indica que a proteína p53 é funcionalmente proficiente, nem que se houvesse mutação ela seria totalmente inativa. Nem todas as mutações têm igual efeito deletério sobre a função do p53, podendo afetar a atividade transcricional de p53, de diversas formas. Alguns mutantes tipo missense podem até adquirir novas funções (Weisz *et al.*, 2007; Brosh & Rotter, 2009). Além disso, a superexpressão de p53 é dependente do contexto e intimamente associada ao desenvolvimento do tumor (Alsner *et al.*, 2008).

A importância do papel do *TP53* é evidenciada em tumores, devido a sua influência direta ou indireta na gênese, progressão, manutenção do tumor e até mesmo na condução do tratamento dos pacientes portadores da doença.

No câncer de mama, foi mostrada a clara associação, da mutação do gene *TP53* com a sobrevida, em grandes estudos prospectivos. Mais especificamente, as mutações do tipo *missense* no gene *TP53*, que afetam suas funções normais, têm sido associadas à pior sobrevida enquanto, outros tipos de mutações estão associadas a redução intermediária da sobrevida, quando comparadas ao gene não-mutado (Olivier *et al.*, 2006; Alsner *et al.*, 2008). Em outro grande estudo prospectivo, tanto a mutação no gene *TP53*, quanto os subgrupos *basal-like* e *ERBB2p* foram associados a menor sobrevida (Langerod *et al.*, 2007).

Além de ser um bom preditor de sobrevida, a presença da mutação do tipo missense no gene *TP53* conferiu maior risco de recidiva e morte em comparação com o tipo selvagem em mulheres com câncer de mama e linfonodos negativos (Ozcelik *et al.*, 2007). Outros estudos, já associaram a existência de mutação no gene *TP53* com a progressão do tumor de mama (Eisenberg & Koifman, 2001). Mutações no gene *TP53* são também potenciais marcadores prognósticos e preditivos, bem como alvos para a intervenção farmacológica (Olivier *et al.*, 2010).

Apesar de não encontrarmos nenhuma mutação nos 4 exons *hotspots* do *TP53*, a continuidade de estudos deste gene em câncer de mama continua sendo tentadora, já que é o

gene mais mutado nos tumores humanos em geral (Wood *et al.*, 2007). E cada vez mais, novas informações sobre o espectro de mutação tumor-específicas vem sendo agregadas ao conhecimento científico, a fim de se decifrar a etiologia do câncer humano.

5.3 Perfil de metilação do DNA na região promotora do gene supressor de tumor *TP53*

Há muito se questiona quais eventos seriam os primeiros a ocorrer no desenvolvimento do tumor, já que várias etapas são necessárias até a formação de uma célula maligna. Hoje, sabe-se que as mutações não são mais os únicos responsáveis pela inativação de genes de controle. As alterações epigenéticas se mostraram extremamente importantes no controle da transcrição gênica, exercendo sua função sobre genes-chaves nas vias de sinalização celular (Esteller, 2005).

A metilação do DNA, uma forma estudada aqui de alteração epigenética, é uma alteração química causada por uma modificação covalente resultante da atividade de uma família de enzimas denominadas metil-transferases (DNMT) que ocorre mais comumente em dinucleotídeos CpG em mamíferos (Hinshelwood & Clark, 2008).

A ruptura de padrões de metilação normais, tanto a hipometilação global como a hipermetilação muito específica de um subconjunto de genes, tem sido relacionadas à formação do câncer. Segundo Jones & Baylin (2002), o silenciamento gênico dos supressores de tumor por meio da metilação dos seus promotores tem-se mostrado tão comum, ou até mais, que as mutações. Aproximadamente 50% dos genes que, quando mutados em linhagens germinativas causam a forma familiar do câncer, são conhecidos por sofrerem metilação nas suas formas esporádicas (Esteller & Herman, 2002).

Ao não encontrarmos resultados de mutações no gene *TP53* em nosso estudo, optamos por investigar outro tipo de alteração que pudesse estar inibindo a atividade da proteína p53 ou não permitindo a execução correta de sua função: analisar o estado de metilação na região promotora do gene *TP53* em 30 pares de amostras de tumores de mama iniciais.

A hipermetilação da região promotora de um gene supressor de tumor tem sido crescentemente reconhecida como um mecanismo alternativo para a inativação da função de um gene supressor de tumor. A região promotora do gene *TP53* não apresenta uma região rica em CpG, não formando, assim, ilhas CpGs. No entanto, uma pequena região no início do promotor, de 85 pb, apresenta-se hipermetilada em diversos tipos tumorais (Hurt *et al.*, 2006).

A hipermetilação do promotor do gene supressor de tumor *TP53* como importante inibidor da expressão do gene foi descrito em algumas neoplasias, tais como a leucemia

linfoblástica aguda, mieloma múltiplo, glioma maligno e metástase cerebral de tumores sólidos (Taghavi *et al.*, 2010). Kang e colaboradores (2001) demonstraram também, a hipermetilação do gene TP53 em 3 dos 19 (16%) carcinomas de mama e que todas as amostras que apresentavam hipermetilação não apresentaram mutações em sua sequência codificadora. Agirre e colaboradores (2003) observaram metilação do gene TP53 em 8 dos 25 casos (32%) de leucemia linfoblástica aguda. Além disso, Feng e colaboradores, 2007 e Toyota e colaboradores (2000) mostraram que o promotor do gene supressor de tumor *TP53* se encontrava hipometilado, quando estava mutado em amostras de tumores malignos de colo retal e mama.

Em nossos resultados, não encontramos hipermetilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP53*, nos 30 pares de amostras estudadas. Corroborando com nossos resultados, Nayak & Das (1999), em um dos primeiros trabalhos correlacionando metilação do promotor do gene *TP53* e câncer de mama, identificaram o perfil de hipometilação.

Na análise de metilação da região promotora do gene *TP53* em 60 pares de amostras de carcinoma mamário esporádico, realizado no LBMT / DGen / UERJ por Pedro Nicolau não foi observada nenhuma região hipermetilada neste gene utilizando a mesma técnica proposta para o presente estudo. Como as amostras utilizadas no estudo citado se apresentavam numa fase mais tardia, incluindo pacientes com grau de Elston 3, sugere-se que o evento não está ligado à progressão do tumor (Nicolau, 2010).

Por outro lado, o estudo de Kang e colaboradores (2001) observaram que 11,5% dos casos de carcinoma mamário, para a mesma região, se apresentavam hipermetilados, utilizando a técnica de pirosequenciamento e sugeriu que o evento está ligado a progressão tumoral.

Um motivo possível para a disparidade de resultados entre os estudos citados pode ter sido a utilização da técnica. Em nosso estudo, assim como no de Pedro Nicolau e Nayak (1999) foi analisado um fragmento único através da técnica MSP-PCR, sendo esta uma técnica menos informativa para o estudo desta região.

Assim como Kang e colaboradores (2001), Radpour e colaboradores (2010) utilizaram uma técnica diferenciada de nosso estudo, a análise de metilação por espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS, que permitiu analisar vários pequenos fragmentos de DNA. Como resultado, Radpour e colaboradores (2010) verificaram a presença de hipermetilação na região promotora do gene *TP53*. Esse resultado foi correlacionado com o encurtamento de telômeros nas células cancerígenas. Este fato sugere que, mesmo sendo baixa a frequência de citosinas

metiladas na região promotora do gene *TP53*, ela é suficiente para acarretar disfunções relacionadas à perda ou a redução da expressão de p53.

O câncer de mama continua sendo uma doença complexa, onde muito se falta pesquisar para alcançar uma detecção precoce e tratamento reparador eficazes. Portanto, a lesão mamária, em suas diferentes formas, continuará a ser o assunto investigado por nosso grupo, ampliando o número de amostras e alcançando melhor conexão da conduta e dos métodos clínicos já existentes, com as novas possibilidades de diagnóstico via marcadores moleculares em tumores e fluidos biológicos.

6 CONCLUSÃO

- Nenhum tipo de mutação foi observado nas sequencias do DNA, provenientes de 34 amostras de tecido mamário de pacientes com suspeita de câncer, nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*;
- A região promotora do gene supressor de tumor *TP53* não apresentou alteração no estado de metilação, nas 30 amostras de tecido mamário analisado quando comparadas às amostras normais de sangue, indicando que outras vias possivelmente estariam interferindo na ação da proteína;
- A realização das correlações entre os dados moleculares e clínicos não foi possível devido a ausência de mutações, nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*; e devido a ausência de alteração no estado de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *TP53*. Além disso, o baixo número de amostral prejudicou possíveis correlações estatísticas.

7 PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de amostras e dados clínicos, a fim de melhor caracterizarmos as lesões impalpáveis.
- Analisar o estado de metilação, da região promotora do gene *TP53*, dos 30 pares de amostras, utilizando a técnica de *real time* ou pirosequenciamento, com o objetivo de determinar se a ausência da região hipermetilada nas amostras foi devido à baixa sensibilidade da técnica de MSP.
- Determinar os alelos de regiões flanqueadoras do gene *TP53* (D17S796 e D17S799) frequentes na população residentes do Rio de Janeiro.
- Investigar possíveis instabilidades de microssatélites de alelos de regiões flanqueadoras do gene *TP53* (D17S796 e D17S799) em tumores impalpáveis BIRADS 3 e 4 de mama esporádicos em mulheres residentes do Estado do Rio de Janeiro.
- Ampliarmos o estudo das microcalcificações presentes nas lesões impalpáveis estudadas, através do estudo morfométrico do CAD (*computer-aided diagnosis*), em colaboração com o Instituto de Engenharia Biomédica da COPEE.
- Estender as análises de evidências moleculares presentes no tecido tumoral para busca em fluidos biológicos, como a saliva e o fluido mamilar.

REFERÊNCIAS

American College of Radiology - ACR. Assessment categories BI-RADS® – mammography. 2003 [acesso em 2010 Aug 13]; 4: 193-197. Disponível em: http://www.acr.org/secondarymainmenucategories/quality_safety/biradsatlas/biradsfaqs.aspx.

Adler DD, Helvie AM, Ikeda MD. Nonpalpable probably benign breast lesions: follow-up strategies after initial detection on mammography. *AJR Am J Roentgenol.* 1990; 155(6): 1195-201.

Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK. DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol.* 2007; 20 (7): 711-21.

Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, Larráyoz MJ, Lahortiga I, Valgañón M, García-Delgado M, Vizmanos JL. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Carcinog.* 2003; 38(4): 201-8.

Albert US, Schulz K, the members of the Guideline Steering Committee and the Chairs of the Task Force Groups. Short version of the guideline - Early Detection of Breast Cancer in Germany. An evidence-, consensus- and outcome-based Guideline according to the German Association of the Scientific Medical Societies and the German Agency for Quality in Medicine. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130(9): 527-536.

Albert US, Altland H, Duda V, Engel J, Geraedts M, Heywang-Köbrunner S, et al. 2008 update of the guideline: early detection of breast cancer in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(3): 339-54.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raft M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell* 4^a ed. New York: Garland Science; 2002.

Alle KM, Moss J, Venegas RJ, Khalkhali I, Klein SR. Conservative management of fibroadenoma of the breast. *Br J Surg.* 1996; 83(7): 992-3.

Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathology.* 2005; 110(2): 178-184.

American cancer society. *What Is Breast Cancer?* Atlanta: American Cancer Society, 2009 [atualizada em: 2010 Nov 17; acesso em 2011 Feb 02]. Disponível em: <http://www.cancer.org>.

American cancer society. *What Causes Breast Cancer?* Atlanta: American Cancer Society, 2009 [atualizada em: 2010; acesso em 2011 Feb 02]. Disponível em: <http://www.cancer.org>.

Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene.* 2006; 25(43): 5898-905.

- Alsner J, Jensen V, Kyndi M, Offersen BV, Vu P, Borresen-Dale AL, et al. A comparison between p53 accumulation determined by immunohistochemistry and TP53 mutations as prognostic variables in tumours from breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2008; 47(4): 600-7.
- Barros ACSD, Nazário AC, Dias EN, Silva HMS, Figueira F. Alterações Funcionais Benignas da Mama, em: *Mastologia Condutas*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Revinter; 1999.
- Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama [Periódico da internet]. 2001 [acesso em 2011 Feb 02]; [aproximadamente 15 p.]. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/024.pdf
- Basset LW. The radiologic clinics of North America breast imaging current status. *Radiol Clin North Am.* 1992; 30(1): 1-286.
- Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, et al. Diagnostic Accuracy of Mammography, Clinical Examination, US, and MR Imaging in Preoperative Assessment of Breast Cancer. *Radiology.* 2004; 233(3): 830-49.
- Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, Nguyen C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2005 15; 65(6): 2170-8.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *OMICS.* 2006; 10(4): 429-43.
- Bièche I, Lidereau R. Oncogenes and suppressor genes in breast cancer. *Presse Med.* 1993; 22 (26): 1209-11.
- Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Libresco S, Givol D, Oren M. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J.* 1985; 4(12): 3209-13.
- Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterisation of the p53 responsive element – identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene.* 1997; 14(1): 85-94.
- Boff RA, Wisintainer F. *Mastologia moderna: abordagem multidisciplinar*. 1ª ed. Caxias do Sul: Mesa Redonda; 2006.
- Bonadonna G, Hortobagyi G, Gianni, A. *Textbook of breast cancer. A Clinical guide to therapy*. 1ª ed. Mosby. 1997.
- Bowen R, Stebbing J, Jones J. A review of the ethnic differences in breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2006; 7(6): 935-942.
- Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 356(3): 227-36.
- Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, Minkin S. Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(16): 1224-37.

- Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer. *Cancer Causes Control*. 2009; 20(9):1539-50.
- Brosh R, Rotter V. Transcriptional control of the proliferation cluster by the tumor suppressor p53. *Mol Biosyst*. 2010; 6(1): 17-29.
- Canella, EO. Detecção do câncer de mama. Revisão da literatura para o clínico. *JBras Med*. 1999; 77(4): 100-1.
- Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*. 2004; 118(6): 671-4.
- Collaborative group on hormonal factors in breast cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001; 358(9291): 1389-99.
- Comet B, Cutuli B, Penault-Llorca F, Bonnetterre J, Belkacémi Y. Male breast cancer. *Bull Cancer*. 2009; 96(2): 181-9.
- Constantinidou A, Jones RL, Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010; 10(8): 1197-213.
- Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 2000; 24(2): 132-8.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(5): 502-11.
- Dias EN, Caleffi M, Silva HMS. A mastologia através da história, em: *Mastologia Atual*. 1º ed. Revinter: Rio de Janeiro; 1994.
- Dixon JM, Mansel RE. ABC of breast diseases: congenital problems and aberrations of normal breast development and involution. *BMJ*. 1994; 309(6957): 797-800.
- Dufloth RM. Carcinoma de mama hereditário em mulheres. brasileiras: mutações dos genes de BRCA1 e BRCA2, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de tissue microarray [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
- Dulaimi E, Hillinck J, de Caceres II, Al-Saleem T, Cairns P. Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(18): 6189-93.
- Dupont WD, Page DL, Parl FF, Vnencak-Jones CL, Plummer WD Jr, Rados MS, et al. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N Engl J Med*. 1994; 331(1): 10-5.
- Duffy SW, Lynge E, Jonsson H, Ayyaz S, Olsen AH. Complexities in the estimation of overdiagnosis in breast cancer screening. *Br J Cancer*. 2008; 99(7): 1176-8.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual. 6^a ed. New York: Springer. 2002.

Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2001; 47(4): 377-88.

Eisenberg ALA. Sobrevida de cinco anos para pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama sem comprometimento de linfonodos axilares. *Coorte Hospitalar, 1992-1996*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992; 1(1): 45–49.

Elmore JG, Jackson SL, Abraham L, Miglioretti DL, Carney PA, Geller BM, et al. Variability in interpretive performance at screening mammography and radiologists' characteristics associated with accuracy. *Radiology*. 2009; 253(3): 641-51.

Ernster VL, Barclay J. Increases in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast in relation to mammography: a dilemma. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1997; (22): 151-6.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer*. 2000; 36(18): 2294-300.

Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol*. 2005; 17(1): 55-60.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*. 2007; 16(1): R50-R59.

Esteller M, Herman J. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *The Journal of Pathology* 2002; 196(1): 1–7.

Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(4): 243-52.

Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, Garrett E, Argani P, Sukumar S. Quantitative Multiplex Methylation-Specific PCR Assay for the Detection of Promoter Hypermethylation in Multiple Genes in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2004; 64(13): 4442–52.

Falkenberry SS; Leggare RD. Risk factors for breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2002; 29(1): 225-32.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5): 759-67.

Feig SA. Ductal carcinoma in situ. Implications for screening mammography. *Radiol Clin North Am*. 2000; 38(4): 653–68.

Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(4): R57.

Filho GB. *Bogliolo Patologia*. 7^o ed. Guanabara Koogan; 2006.

Galukande M; Kiguli-Malwadde E. Rethinking breast cancer screening strategies in resource-limited settings. *African Health Sciences.* 2010; 10(1): 89-92.

Ghosh K, Vachon CM, Pankratz VS, Vierkant RA, Anderson SS, Brandt KR. Independent association of lobular involution and mammographic breast density with breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(22): 1716-23.

Glass AG, Lacey JV Jr, Carreon JD, Hoover RN. Breast cancer incidence, 1980 - 2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(15): 1152-61.

Greenberg R, Skornick Y, Kaplan O. Management of breast fibroadenomas. *J Gen Intern Med.* 1998; 13(9): 640-5.

Hainaut, P. TP53 tumor suppressor gene: 20 years (and ten thousand mutations) later. *Bull Cancer.* 2000; 87(1): 11-8.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990; 250(4988): 1684-9.

Hansel W, Enright F, Leuschner C. Destruction of breast cancers and their metastases by lytic peptide conjugates in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 2: 183-9.

Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Helman S. Diseases of the Breast. *JNCI.* 1997; 89(1): 85.

Hermann G, Janus C, Schwartz IS. Occult malignant breast lesions in 114 patients: Relationship to age and the presence of microcalcifications. *Radiology.* 1988; 169(2): 321-324.

Hinshelwood RA, Clark SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J Mol Med.* 2008; 86(12): 1315-28.

Hollstein M, Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol.* 2010; 220(2): 164-73.

Howe HL, Wu X, Ries LA, Cokkinides V, Ahmed F, Jemal A, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer.* 2006; 107(8): 1711-42.

Hurt EM, Thomas SB, Peng B, Farrar WL. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5(9): 1154-60.

Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, et al. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(23): 12770-5.

Hutson SW, Cowen PN, Bird CC. Morphometric studies of age related changes in normal human breast and their significance for evaluation of mammary cancer. *J. Clin. Pathol*. 1985; 38(3): 281-7.

International Agency Research of Cancer. Lyon: World Health Organization. [atualizada em: 2011; acesso em: 2011Jan05]. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986; 320(6057): 84-5.

Johnson SM, Shaw JA, Walker RA. Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at p53, BRCA1 and BRCA2. *Int J Cancer*. 2002; 98(2): 205-9.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(6): 415-28.

Jovanovic J, Ronneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*. 2010; 4(3): 242-54.

Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest*. 2001; 81(4): 573-9.

Katsama A, Sourvinos G, Zachos G, Spandidos, DA. Allelic loss at the *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* loci in human sporadic breast carcinoma. *Cancer Lett*. 2000; 150(2): 165-70.

Ketterhagen JP, Quackenbush SR, Haushalter RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet*. 1984; 158(2): 120-3.

Kinkel K, Gilles R, Féger C, Guinebrière JM, Tardivon AA, Masselot J, et al. Focal areas of increased opacity in ductal carcinoma in situ of comedo type: mammography-pathologic correlation. *Radiology*. 1994; 192(2): 443-446.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(10): 773-85.

Koutras ED, Kokkinakis G. Computer aided diagnosis of breast cancer in digitized mammograms. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2002; 26(5): 309-19.

Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*. 1994; 331(1): 5-9.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979; 278(5701): 261-3.

- Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IR, Ik Dahl T, Kåresen R, Borresen-Dale AL, Jeffrey SS. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(3): R30.
- Lehmann U, Langer F, Feist H, Glockner S, Hasemeier B, Kreipe H. Quantitative Assessment of Promoter Hypermethylation during Breast Cancer Development. *Am J Pathol.* 2002; 160(2): 605–12.
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002; 18(11): 1427-31.
- Liu S, Li S, Du Y. Polychlorinated biphenyls (PCBs) enhance metastatic properties of breast cancer cells by activating Rho-associated kinase (ROCK). *PLoS One.* 2010; 5(6): 1-8.
- Maskarinec G, Meng L, Ursin G. Ethnic differences in mammographic densities. *Int J Epidemiol.* 2001; 30(5): 959–65.
- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, 39. cytokeratin 5, and Pcadherin: three markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005; 447(4): 688 - 94.
- Mendelson EB, Baum JK, Berg W, Merritt C, Rubin E: *Breast Imaging Reporting and Data System BIRADS: Ultrasound.* Reston VA: American College of Radiology; 2003.
- Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde. *Controle do Câncer de Mama – Documento Consenso.* Rio de Janeiro, 2004.
- Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde. *Incidência do Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro; 2007.
- Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde. *Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro, 2009.
- Mullan PB, Millikan RC. *Cell Mol Life Sci.* Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(24): 3219-32.
- National Breast and Ovarian Cancer Centre. *Breast cancer risk factors: a review of the evidence.* National Breast and Ovarian Cancer Centre, Surry Hills, NSW, 2009.
- Nayak BK, Das BR. Mutation and methylation status of p53 gene promoter in human breast tumours. *Tumour Biol.* 1999; 20(6): 341-6.
- Nazário ACP, Rego MF, Oliveira VM. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 29(4): 211-9.
- National Comprehensive Cancer Network. *Breast cancer screening and diagnosis guidelines USA: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology;* 2007.
- Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett.* 2003; 190(2): 125-33.

Nicolau P. Estudo do perfil de metilação na região promotora dos genes hMLH1, TP53 e CHD5 em carcinomas mamários esporádicos de mulheres do Estado do Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro; 2010.

Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(4): 1157-67.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(1): a001008.

Ozcelik H, Pinnaduwage D, Bull SB, Andrulis IL. Type of TP53 mutation and ERBB2 amplification affects survival in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 105(3): 255-65.

Özer E, Yuksel E, Kizildag S, Sercan O, Özen E, Canda T, Sakizli M. Microsatellite instability in early-onset breast cancer. *Pathology* 2002; 198(8): 525-30.

Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and 40. cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch.* 2007; 450(1): 73 - 80.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2): 74-108.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406(6797): 747-52.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007; 26(15): 2157-65.

Pfeifer GP, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet.* 2009; 125(5-6): 493-506.

Pharoah PD, Da N, Duffy E, Easton DF, Ponder BAJ. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997; 71(5): 800-9.

Pick PW and Iossifi des IA. Occurrence of breast carcinoma within a fibroadenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1984; 108(7): 590-4.

Pisano ED, Gatsonis C, Hendrick E, Yaffe M, Baum JK, Acharyya S, Conant EF, et al. Digital Mammographic Imaging Screening Trial (DMIST) Investigators Group. *N Engl J Med.* 2005; 353(17): 1773-83.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation.* 2007; 117 (1): 3155-62.

Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud pública de México.* 2009; 51 (2): S141-S146.

Quadros L. Classificação Bi-Rads® para laudos de mamografia. *Rev Bras Mastol.* 2003; 13(4): 147.

Radpour R, Barekati Z, Haghghi MM, Kohler C, Asadollahi R, Torbati PM, et al. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol.* 2010; 23(5): 763-72.

Reddy DH, Mendelson EB. Incorporating new imaging models in breast cancer management. *Curr Treat Options Oncol.* 2005; 6(2): 135-45.

Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1988; 85(14): 5146-50.

Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(3): a001016.

Rosen PP, Hoda SA. *Breast pathology: diagnosis by needle core biopsy.* 2^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. *Epigenetic mechanisms of gene regulation.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 1996; 32: 24-45.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2^a ed. NY: Cold Spring Harbor; 1989.

Santos RP. Radiologia das lesões infraclínicas, em: Duarte DL. *Radiologia da Mama.* Rio de Janeiro, MEDSI, 1994.

Schmidt MM, Powers KJ. Breast imaging: screening and evaluation. *Clin Obstet Gynecol.* 2011; 54(1) :103-9.

Schmitt FC, Gonçalves J, Almeida S, Cordeiro R, Braz M, de Lucca L. Estudo crítico das doenças benignas não-neoplásicas da mama: reavaliação anatomopatológica de 102 casos. *J Brás. Ginec.* 1991; 101(7): 283-6.

Slowitz ML, Gigante DP, Menezes AMB. Conduitas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Revista de Saúde Pública.* 2005; 39(3): 340-349.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007; 11(3): 259-73.

Shu KX, Li B, Wu L-X. The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids and SurfacesB. Biointerfaces.* 2007; 55(1): 10-8.

Silvestrini R, Daidone MG, Benini E, Tomasic G, Boracchi P, Salvadori B, et al. Validation of p53 accumulation as a predictor of distant metastasis at 10 years of follow-up in 1400 node-negative breast cancers. *Clin Cancer Res.* 1996; 62(12): 2007-13.

Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg.* 2003; 237(4): 474-82.

- Smith RA. The evolving role of MRI in the detection and evaluation of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356(13): 1362-4.
- Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60(2): 99-119.
- Sociedade Brasileira de Mastologia. Risco de câncer de mama no homem é semelhante ao da mulher com uma diferença: eles não se cuidam. 2007 [acesso em 2010nov23]; 3(2): [aproximadamente 4 p.] Disponível em: <http://www.sbmastologia.com.br>.
- Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004; 40(18): 2667-75.
- Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006; (7): 127-42.
- Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD, Berkelman RL. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA*. 1991; 265(15): 1985-90.
- Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(3): 165-8.
- Sugimura T. Past victories, uncertainty, and reflections on the present and progress in the future. *Gastric Cancer*. 1998; 1(1): 5-7.
- Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Khademi H, Malekzadeh R, Moaven O, Memar B, A'rabi A, Abbaszadegan MR. p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2010; 13(10): 138.
- Tanaka K, Akiyama F, Nishikawa N, Kimura K, Gomi N, Oda K, Iwase T. Invasive carcinoma of the breast accompanied by coarse calcification. *AJR Am J Roentgenol*. 2009; 193(1): W70-1.
- Tao MH, Shields PG, Nie J, Millen A, Ambrosone CB, Edge SB, Krishnan SS, Marian C, Xie B, Winston J, Vito D, Trevisan M, Freudenheim JL. DNA hypermethylation and clinicopathological features in breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 114(3): 559-68.
- Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet*. 1995; 9(4): 444-50.
- Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(2): 710-5.

- Troester MA, Hoadley KA, Parker JS, Perou CM. Prediction of toxicant-specific gene expression signatures after chemotherapeutic treatment of breast cell lines. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(16): 1607-13.
- Tse GM, Tan PH, Pang ALM, Tang APY, Cheung HS. Calcification in breast lesions: pathologists' perspective. *J Clin Pathol* 2008; 61(2): 145-51.
- Turaga K, Geza A, Laronga C. Gene expression profiling in breast cancer. *Cancer Control.* 2010; 17(3): 177-82.
- Vachon CM, Van Gils CH, Sellers TA, Ghosh K, Pruthi S, Brandt KR, et al. Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(6): 217.
- Vargo-Gogola T; Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(9): 659-72.
- Verma M; Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.* 2002; 3(12): 755-63.
- Vorrherr H. The Breast: Morphology, Physiology, and Lactation. *JAMA.* 1975; 232(7): 758.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(4): 275-83.
- Wei EK, Wolin KY, Colditz GA. Time Course of Risk Factors in Cancer Etiology and Progression. *J of C Oncology.* 2010; 28(26): 4052-7.
- Weinberg WC, Brown PD, Stetler-Stevenson WG, Yuspa SH. Modulation of hair follicle cell proliferation and collagenolytic activity by specific growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 642(26): 281-90.
- Weisz L, Oren M, Rotter V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene.* 2007; 26(15): 2202-11.
- Whibley C, Odell AF, Nedelko T, Balaburski G, Murphy M, Liu Z, Stevens L, et al. Wild-type and Hupki (human p53 knock-in) murine embryonic fibroblasts: p53/ARF pathway disruption in spontaneous escape from senescence. *J Biol Chem.* 2010; 285(15): 11326-35.
- Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21(35): 5462– 82.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007; 318(5853): 1108-13.
- Yoo CB, Jones P. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006; 5(1): 37-50.
- Yu X, Chu TM, Gibson G, Wolfinger RD. A mixed model approach to identify yeast transcriptional regulatory motifs via microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004; 3(22): 29 - 35.

Zang S, Ji Ch, Qu X, Dong X, Ma D, Ye J, et al. A study on Notch signaling in human breast cancer. *Neoplasma*. 2007; 54(4): 304-10.

Zhou W, Muggerud AA, Vu P, Due EU, Sorlie T, Borresen-Dale AL, et al. Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution. *Mol Oncol*. 2009; 3(3): 214-19.

Zupnick A and Prives C. Mutational Analysis of the p53 Core Domain L1 Loop. *J Biol Chem*. 2006; 281(29): 20464–73.

APÊNDICE – Padronização das Técnicas de Análise de Fragmentos

1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Em nosso trabalho, foi iniciada a análise de microssatélites com a padronização da metodologia de análise de fragmentos em amostras de DNA de células de sangue periférico (controle normal) e amostras de DNA de células de tecido provenientes de biópsia de pacientes com suspeita de câncer de mama esporádico (tecido tumoral).

1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o estudo das instabilidades genômicas, foram analisados 2 loci STR, que localizam-se em genes supressores de tumor: D17S796 e D17S799 – regiões flanqueadoras ao gene *TP53*.

As reações da PCR continham 5-10 ng de DNA genômico, 5 µl de tampão STR 10X (Invitrogen®), 1 µM de cada iniciador e 0,5 U da enzima Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®) num volume final de 25 µl. O programa da PCR consistiu em primeira desnaturação à 95°C por 10 minutos, seguida por 10 ciclos à 94°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos, seguida de 20 ciclos à 89°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos. Após os 30 ciclos, realizou-se a extensão final à 72°C por 10 minutos. As reações da PCR foram realizadas em termocicladores *GeneAmp* (Applied Biosystems®). Na tabela 8, estão listados os nomes dos loci STR, sequência dos iniciadores, tamanho dos amplicons, marcadores, tema de repetição e referências bibliográficas.

Tabela 8: Loci STR, localizados na região flanqueadora à TP53 (17p), analisados na verificação de instabilidades genômicas.

Locus	Iniciadores	Amplicon (pb)	Marcador	Tema de repetição	Referência
D17S796	CAATGGAACCAAATGTGGTC - F AGTCCGATAATGCCAGGATG - R	144-174	6-FAM	CA	Özer <i>et al.</i> , 2002
D17S799	ATTGCCAGCCGTCAGTT - F GACCAGCATATCATTATAGACAAGC - R	185-200	HEX	CA	Johnson <i>et al.</i> , 2002

Para a montagem da placa de injeção, foi preparada uma solução contendo 8,7 μL de formamida e 0,3 μL do marcador de tamanho de fragmento, ROX (Applied Biosystems®) para cada poço da placa de 96 poços. Depois foi aplicado 1 μL de amostra, totalizando 10 μL de reação por poço. Posteriormente, as amostras contidas na placa foram desnaturadas a 95 °C por 3 minutos e acondicionadas no gelo para que não renaturassem. A placa era então levada ao seqüenciador 3130 *Genetic Analyzers* ROX (Applied Biosystems®).

Após a eletroforese, os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *software* *Peak Scanner*TM v 1.0 (Applied Biosystems) (Figura 11).

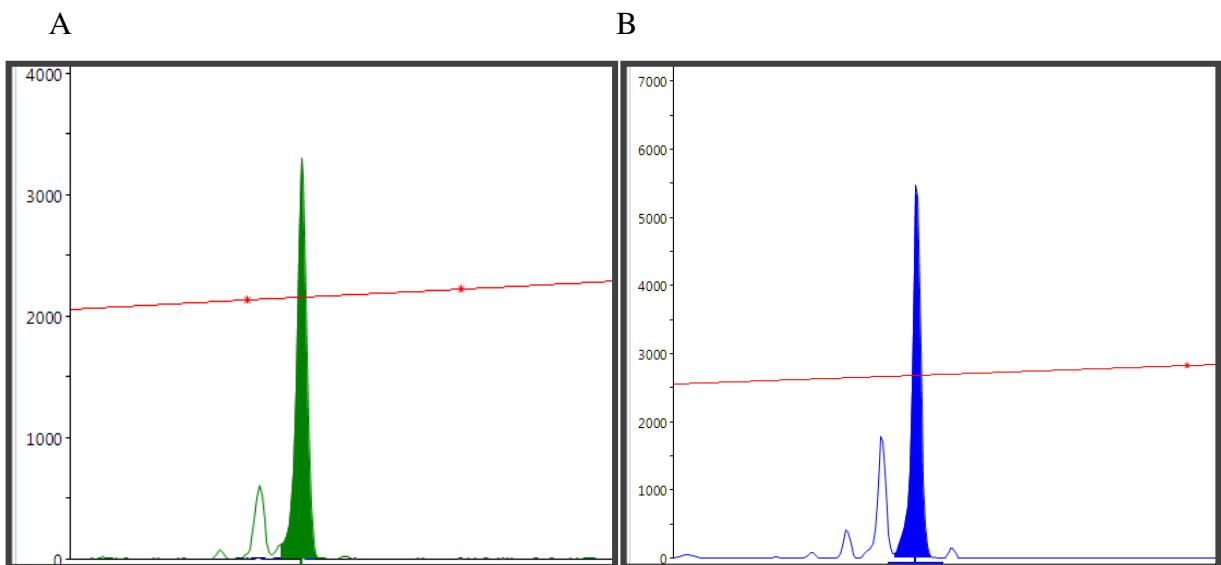


Figura 11: Eletroferograma de amostra controle, para os loci D17S796 e D17S799, respectivamente. A: O pico em verde se encontra o alelo de tamanho 142 pb. B: O pico em azul se encontra o alelo de tamanho 185 pb.

1.2 Determinação dos Alelos – Construção de Escada Alélica

Após a padronização da reação de PCR e da eletroforese aplicamos esta técnica em dez amostras de sangue periférico de mulheres saudáveis como controle, com o propósito de identificarmos primariamente os possíveis alelos informativos representantes da população do Rio de Janeiro para os loci estudados (D17S796 e D17S799). Utilizando os alelos identificados nas dez amostras foi construída uma escada alélica para ambos os loci utilizando o *Software GeneMapper*TM (Applied Biosystems). Para o locus D17S796 foram identificados

os seguintes alelos: 142, 162, 166, 168, 170, 172 e 174 (Figura 12). Já para o locus D17S799 foram identificados os seguintes alelos: 185, 191, 195 e 197 (Figura 13).

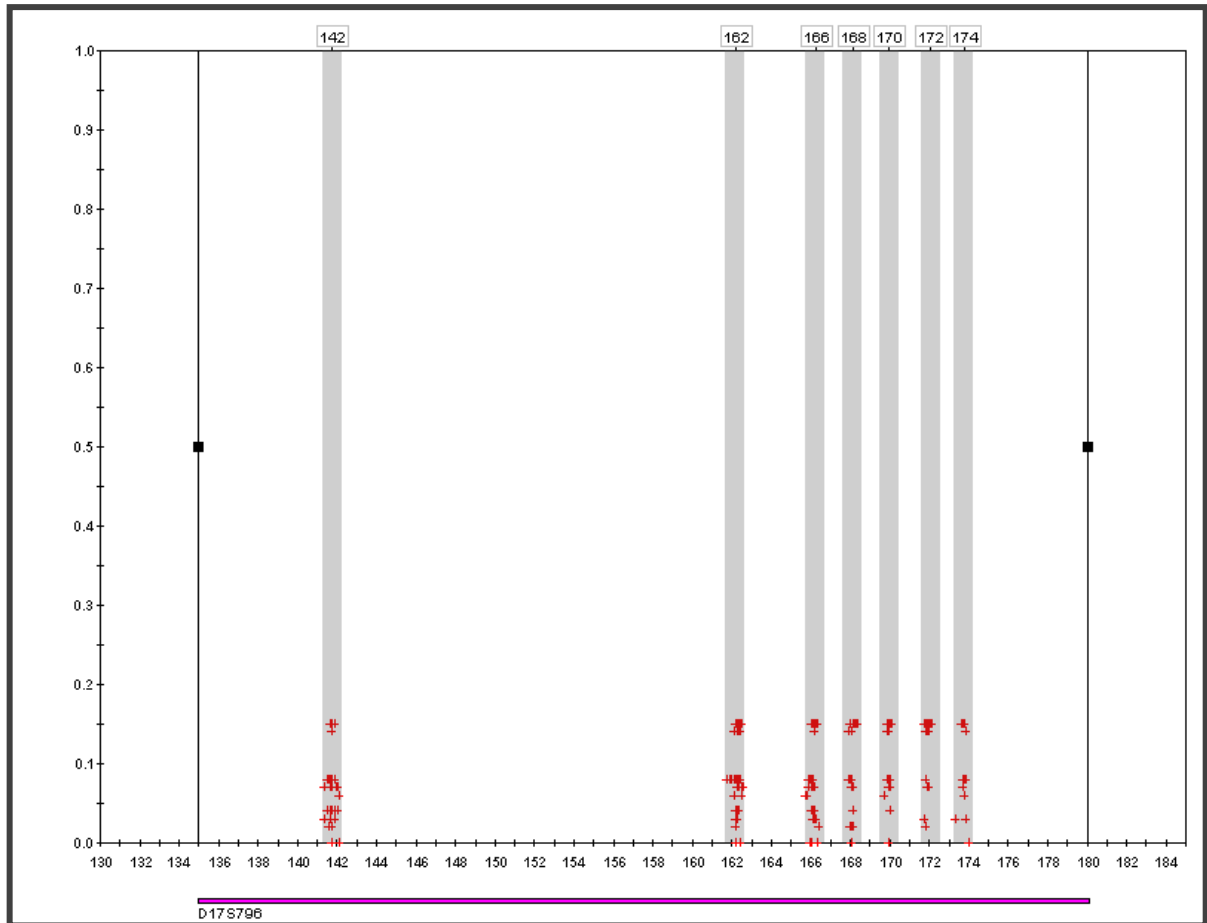


Figura 12: Escada alélica do locus D17S796. Nesta escala é observado o grupo de sete alelos encontrados em amostras de pacientes saudáveis para o locus D17S796.

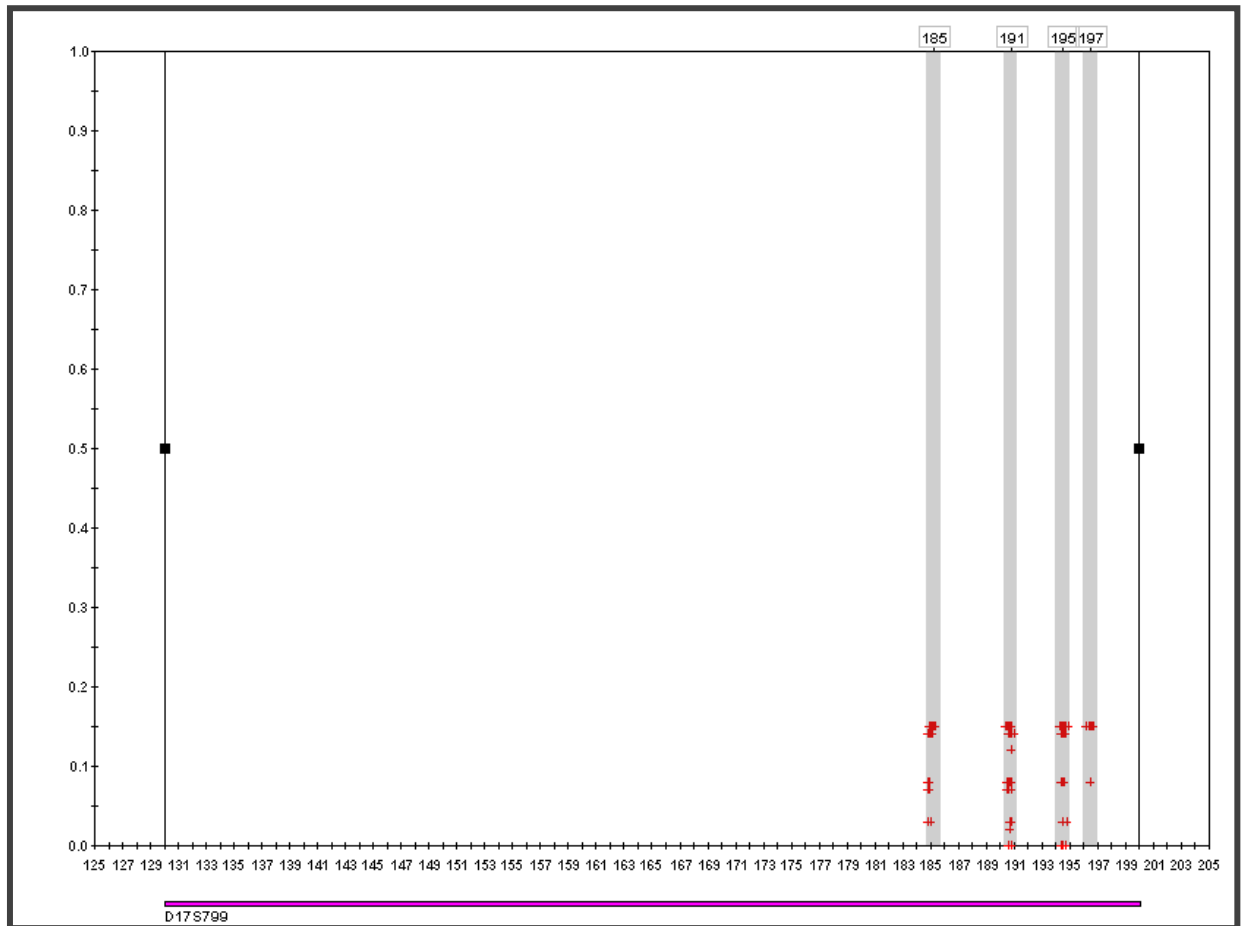


Figura 13: Escada alélica do locus D17S799. Nesta escala é observado o grupo de sete alelos encontrados em amostras de pacientes saudáveis para o locus D17S799.

Após a identificação dos alelos para o locus D17S796, foram genotipados 18 amostras de DNA de sangue das pacientes (Tabela 8). E para a determinação dos alelos para o locus D17S799 foram genotipados 14 amostras de DNA de sangue das pacientes (Tabela 9).

Tabela 8: Alelos presentes nas amostras analisadas para o locus D17S796. P: número da paciente. Tipo: se o gene se apresenta em homozigose ou heterozigose. Posição do alelo: Posição que os alelos se encontram no eletroferograma.

P	Tipo	Posição do Alelo (pb)	
1	Heterozigoto	166	170
2	Heterozigoto	166	170
4	Homozigoto	160	-
6	Homozigoto	160	-
9	Heterozigoto	166	170
10	Heterozigoto	162	166
12	Heterozigoto	162	166
13	Homozigoto	142	-
14	Homozigoto	162	-
16	Homozigoto	162	-
17	Homozigoto	162	-
18	Heterozigoto	168	172
24	Heterozigoto	166	176
30	Homozigoto	142	-
32	Homozigoto	142	-
33	Heterozigoto	162	174
34	Homozigoto	162	-
36	Homozigoto	162	-

Tabela 9: Alelos presentes nas amostras analisadas para o locus D17S799. P: número da paciente. Tipo: se o gene se apresenta em homozigose ou heterozigose. Posição do alelo: Posição que os alelos se encontram no eletroferograma.

P	Tipo	D17S799 (pb)	
1	Homozigoto	185	-
2	Heterozigoto	185	195
9	Heterozigoto	185	191
10	Homozigoto	191	-
12	Heterozigoto	191	197
13	Homozigoto	191	-
14	Heterozigoto	191	197
16	Homozigoto	185	-
29	Homozigoto	195	-
30	Heterozigoto	185	191
33	Heterozigoto	191	195
34	Heterozigoto	191	195
36	Heterozigoto	185	195
38	Heterozigoto	185	197