



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

Pedro Nicolau Neto

**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**

Rio de Janeiro

2010

Pedro Nicolau Neto

**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 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.<sup>a</sup> Dra. Claudia Vitória de Moura Gallo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Carla de Souza Góes

Rio de Janeiro

2010

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

N639 Nicolau Neto, Pedro.  
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 / Pedro Nicolau Neto. - 2010.  
112 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo  
Coorientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Andréia Carla de Souza Góes

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

1. Neoplasias da Mama. 2. Metilação de DNA – Genética. 3. Genes p53 - Genética. I. Gallo, Cláudia Vitória de Moura. II. Góes, Andréia Carla de Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 618.19-006

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo  
CRB7/7341

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

Pedro Nicolau Neto

**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 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 19 de março de 2010

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréia Carla de Souza Góes

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Jaqueline Gusmão da Silva Marien

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Moraes Giannini

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Marcelo Aguiar Costa Lima

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2010

## DEDICATÓRIA

para meus amigos, para minha família,  
para meu amor, para Ele.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, por confiarem em mim. Por terem me proporcionado o caminho que me fez chegar a este trabalho. Agradeço a eles pela luta do dia a dia, pelos momentos de incerteza e dificuldade que passamos e vencemos juntos. Esta vitória não é minha, ela é nossa. E também à minha irmã, por ser uma das pessoas mais chatas que eu conheço, porém, uma garota muito carinhosa e que sempre me apóia e quer o melhor para minha vida.

Não posso deixar de agradecer a toda a minha família! Uma grande família, gigante, enorme, mas que cabe em meu coração. Devido a minha influência negativa, mais duas biólogas estão sendo formadas! À minha querida avó Marina por ser um exemplo de fortaleza, ao meu avô AP que mesmo não estando mais ao nosso lado está sempre em nossos pensamentos como um exemplo de homem, que amava a seus próximos e era amado por todos. Agradeço também a vovó Amélia, que pouco conheci mais que sempre tinha um sorriso no rosto e sempre estará sempre em meu coração. Aos meus tios e primos, pessoas muito queridas. Na verdade, somos todos irmãos!

Agradeço à Cynthia, futura senhora Pedro Nicolau Neto! Huhu!!! Por ser a principal fã deste pequeno cientista. Por ser minha melhor amiga, minha companheira, parte da minha vida. Sem você seria impossível chegar até aqui e foi por nós que cheguei.

Agradeço aos meus amigos por me proporcionarem os momentos que me fizeram agüentar essa dureza! Sempre um desafogo no final de semana. Aos amigos da UERJ, principalmente PT, Eric, Tatiana e Suellen. Nossas reuniões semanais com discussões científicas no escritório foram de extrema importância na elaboração deste trabalho.

Agradeço às minhas colegas de laboratório, incluindo a Silvinha que nos abandonou. Esses quase dois anos de trabalho foram ótimos. Muitas brincadeiras, muito bate-papo e, claro, muito trabalho. Torço muito pelo sucesso na vida de vocês. Queria dedicar um espaço especial à Carla, a qual sofreu muito com minhas brincadeiras e trocadilhos. Espero que tenha te ensinado alguma coisa. Boa sorte nessa longa caminhada que é a vida científica.

Agradeço ao ser mais estranho e elétrico que conheço, o Trance-Gilson. Valeu mesmo meu parceiro. Principalmente por te me apresentado a técnica do bissulfito!

Deixo registrada minha alegria por ter participado da equipe da prof. Cláudia Gallo. Agradeço por todos os bate-papos na porta de sua sala, por tirar minhas dúvidas e por me orientar, ou co-orientar. Sei lá.

Fica minha alegria em poder ter continuado meu trabalho com a prof. Andréa Goes. Um exemplo profissional, digna e correta sempre. Às vezes um pouco estressada, é verdade, mas sempre com paciência para aturar as minhas desculpas. Não sei como ela agüentou. Andréa, muito obrigado.

Um momento de reflexão:

Agradeço pelas oportunidades em minha vida, pelas escolhas que pude fazer, pelo caminho que tracei e que continuarei traçando. Pelos dias calmos e principalmente pelos difíceis, pois com eles aprendemos. A dificuldade me fez forte. Sei que muitas vezes fraquejei e quis jogar a toalha, mas consegui terminar este trabalho e não o fiz sozinho. Todos aos que agradei anteriormente participaram dele, mesmo sem saber. Posto tudo isto, gostaria de agradecer ao meu Mestre, por seu exemplo, palavra e amor. Agradeço a todas as forças do bem que caminham ao meu lado e, claro, agradeço a Deus, meu Senhor, meu Pai.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

NICOLAU NETO, Pedro. *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*. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Realizamos um trabalho com o intuito de verificar o perfil de metilação de genes supressores tumorais e de reparo em carcinomas de mama esporádicos, analisando 60 amostras de tumores de mama provenientes de biópsias de mama de mulheres naturais do Estado do Rio de Janeiro. Para isto determinamos a frequência de hipermetilação na região promotora dos genes supressores de tumor *TP53* e *CHD5* e de reparo *hMLH1*. Posto isto, verificamos que nenhuma amostra apresentou hipermetilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP53*. Com relação à análise do gene supressor de tumor *CHD5*, observamos que 15% das amostras apresentaram hipermetilação em sua região promotora. Na análise do perfil de metilação do gene de reparo *hMLH1* foi observado que 21,6% das amostras apresentaram hipermetilação no promotor deste gene e, 12 das 13 pacientes cujas amostras apresentaram hipermetilação no promotor do gene *hMLH1* apresentavam idade de diagnóstico superior a 45 anos. Ainda visando analisar o funcionamento do gene *hMLH1* em tumores de mama, analisamos a frequência de instabilidade em microssatélites no STR D3S1611, que se encontra dentro da sequência do gene *hMLH1*. A frequência de perda de heterozigose foi de 13% e houve correlação entre a presença de LOH e graduação histológica de Elston elevada (II e III).

Palavras-chave: Câncer de mama. Metilação no DNA. *TP53*. *hMLH1*. *CHD5*.

## ABSTRACT

NICOLAU NETO, Pedro. *Study of the DNA methylation profile in the promoter region of hMLH1, TP53 and CHD5 genes in sporadic breast carcinomas of women population of Rio de Janeiro*. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

In order to verify the DNA methylation profile of tumor suppressor and DNA repair genes in sporadic breast carcinomas, we analyzed 60 samples of breast tumors from biopsies of women born in the State of Rio de Janeiro, Brazil. We analyzed the frequency of DNA hypermethylation in the promoter region of the tumor suppressor genes TP53 and CHD5 and the DNA repair gene hMLH1. We observed no hypermethylation in the TP53 promoter region. On the other side, 15% and 21,6% of the samples showed hypermethylation in the CHD5 and hMLH1 promoter regions, respectively. Furthermore, 12 of 13 patients who showed hypermethylation in the hMLH1 gene promoter were diagnosed after 45 years old. We also analyzed the microsatellite instability in the locus D3S1611, located in the hMLH1 gene, and observed a 13% loss of heterozygosity (LOH) frequency. In addition, LOH was associated with higher Elston histological grades II and III.

Keywords: Breast cancer. DNA methylation. *TP53*. *hMLH1*. *CHD5*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incidência e mortalidade causada pelo câncer de mama no mundo .....	15
Figura 2 -	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira .....	16
Figura 3 -	Incidência do câncer de mama aumentando conforme a progressão da idade .....	17
Figura 4 -	Sobrevida global relativa de 10 anos associada com o estadiamento TNM pela AJCC/UICC .....	25
Figura 5 -	Atividade do sistema de reparo MMR .....	30
Figura 6 -	Esquema simplificado ilustrando a atividade da proteína supressora de tumor p53 na indução à apoptose .....	32
Figura 7 -	Vias de regulação da proteína p53 .....	33
Figura 8 -	Gráfico apresentando a porcentagem de mutação do gene <i>TP53</i> nos principais tipos de câncer .....	35
Figura 9 -	Influência do <i>CHD5</i> sobre a atividade da proteína p53 .....	36
Figura 10 -	Silenciamento gênico por ação da metilação do DNA .....	39
Figura 11 -	Inativação da transcrição gênica devido à hipermetilação da região promotora em célula tumoral .....	40
Figura 12 -	Vias de desenvolvimento tumoral a partir de alterações no padrão de metilação do genoma .....	41
Figura 13 -	Etapas da reação de modificação do DNA com bissulfito de sódio .....	47
Figura 14 -	Diferença na sequência do DNA após tratamento com bissulfito de sódio .....	48
Figura 15 -	Exemplos de instabilidades genômicas em microssatélite verificadas em nosso trabalho .....	53
Figura 16 -	Análise do perfil de metilação na região promotora do gene <i>hMLH1</i> ...	56
Figura 17 -	Perfil de hipermetilação na região promotora do gene <i>hMLH1</i> .....	57
Figura 18 -	Análise do perfil de metilação da região promotora do gene <i>TP53</i> .....	58
Figura 19 -	Análise do perfil de metilação da região promotora do gene <i>CHD5</i> .....	59
Figura 20 -	Eletroforese dos produtos amplificados no locus D3S1611 .....	59
Figura 21 -	Eletroforese dos pares de amostras apresentando LOH .....	60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Influencia de fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama .....	16
Quadro 2 –	Classificação TNM resumida para o câncer de mama de acordo com o manual de estadiamento da AJCC 6 <sup>o</sup> - Edição .....	24
Quadro 3 –	Estadiamento TNM .....	25
Quadro 4 –	Sequencias dos indicadores da reação de MSP, tamanho dos produtos ( <i>amplicon</i> ) e temperaturas de pareamento .....	48
Quadro 5 –	Características clínico-histopatológicas dos 60 pacientes estudados determinadas pela Dra. Elizabeth Avvad .....	54
Quadro 6 –	Representação dos resultados obtidos, estratificado por amostra, na análise do perfis de metilação e de instabilidade em microsatélite .....	61
Quadro 7 –	Correlação entre as características clínico-histopatológicas das amostras de carcinoma mamário e os resultados obtidos na análise do perfil de metilação na região promotora dos genes <i>hMLH1</i> e <i>CHD5</i> e da frequência de instabilidades no STR D3S1611 .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM RAD-3 related</i>
Bax	<i>BCL-2 associated protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
BER	<i>Reparo por excisão de base</i>
Bid	<i>BH3 interaction domain death agonist</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
Bub1	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
DDB2	<i>Damage-specific DNA binding protein 2</i>
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNMT	<i>DNA metil-transferase</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EXO1	Exonuclease 1
GAS2	<i>Growth arrest-specific 2</i>
GE	Graduação histológica de Elston
HCl	Ácido clorídrico
IGF-2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
MBD	<i>Methyl binding domain</i>
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MeCP2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
Mg	<i>Miligrama</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSH3	<i>MutS homolog 3</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	Reparo de excisão de nucleotídeos
p53	Proteína P53
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
PMS1	<i>Postmeiotic segregation increased 1</i>
PMS2	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
RE	Receptor de estrogênio
RFC	Fator de replicação C
RNA	Ácido ribonucleic
RNAi	RNA de interferência
RP	Receptor de progesterona
RPA	Proteína de replicação A
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-acetato EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
<i>TGF<math>\beta</math>RII,</i>	Transforming growth factor- $\beta$ receptor type II
<i>TP53</i>	gene da p53
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum D</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{l}$	microlitro
cm	centímetro
g	grama
kDa	quilodalton
L	litro
M	Molar
mA	miliAmpére
mL	mililitro
mM	milimolar
$p$	Erro padrão
rpm	Revoluções por minuto
U	Unidade
V	Volts
W	Watts
X	Vezes concentrado

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
1.1	<b>Geral</b> .....	43
1.2	<b>Específicos</b> .....	43
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
2.1	<b>Amostras biológicas de pacientes com câncer de mama</b> .....	44
2.2	<b>Extração de DNA genômico</b> .....	44
2.3	<b>Eletroforese do DNA genômico</b> .....	45
2.4	<b>Modificação do DNA com bissulfito de sódio</b> .....	45
2.5	<b>PCR para análise do estado de metilação do DNA</b> .....	47
2.6	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%</b> .....	49
2.7	<b>Deteção do material amplificado por coloração com nitrato de prata</b> .....	50
2.8	<b>PCR para amplificação do <i>locus</i> STR</b> .....	50
2.9	<b>Eletroforese em gel de agarose 2,0%</b> .....	51
2.10	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante</b> .....	51
2.10.1	<u>Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata</u> .....	52
2.11	<b>Determinação de instabilidade genômica</b> .....	52
2.12	<b>Análise estatística</b> .....	53
3	<b>RESULTADOS</b> .....	54
3.1	<b>Características clínico-histopatológicas das amostras de câncer de mama esporádicos</b> .....	54
3.2	<b>Análise do perfil de metilação da região promotora do gene de reparo <i>hMLH1</i></b> .....	56
3.3	<b>Análise do perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor <i>TP53</i> em amostras de carcinoma mamário</b> .....	57
3.4	<b>Análise do perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor <i>CHD5</i></b> .....	58
3.5	<b>Frequencia de instabilidade do STR D3S1611</b> .....	59
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

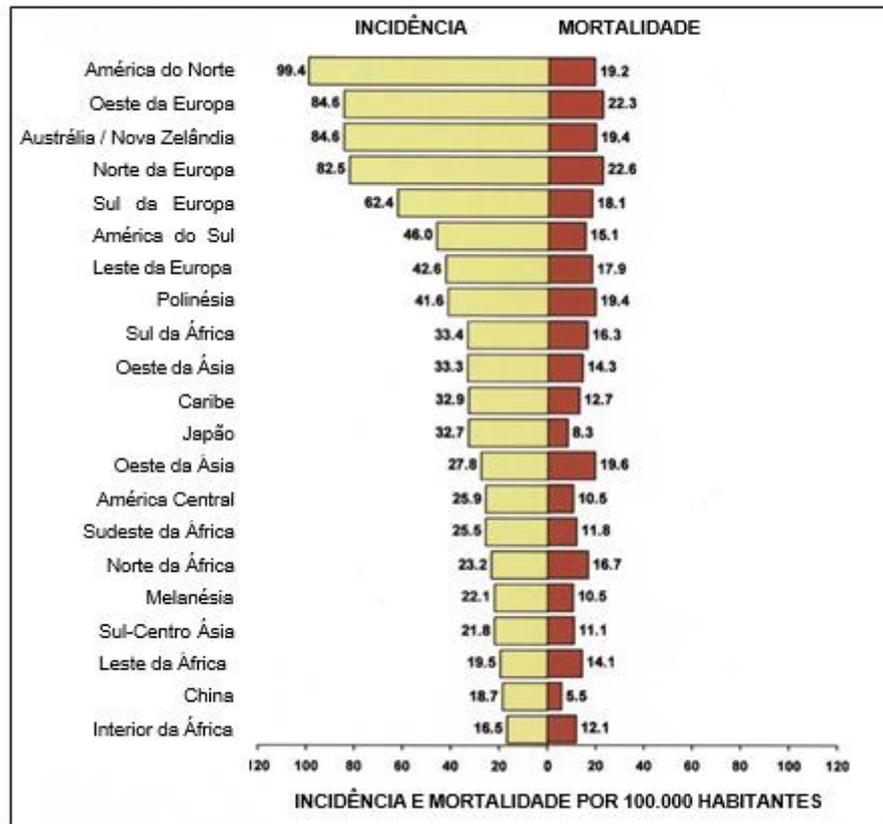
## INTRODUÇÃO

### **Incidência e fatores de risco do câncer de mama**

O câncer de mama é o mais freqüente e mortal tipo de câncer entre as mulheres no mundo. Por se tratar de uma doença multifatorial, a prevenção se torna difícil, desencadeando mais de 1,2 milhões de casos relatados a cada ano, o que representa uma incidência de 10 a 12% de mulheres desenvolvendo a doença. De todas as formações tumorais femininas, o câncer de mama representa 23%, sendo a segunda formação tumoral mais incidente entre as mulheres (Parkin et al, 2005). A figura 1 apresenta as taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama no mundo. Verifica-se que os países mais desenvolvidos apresentam as maiores incidências de câncer de mama. Entretanto, países com taxas de incidência menores, como Polinésia e pertencentes ao oeste da Ásia apresentam taxas de mortalidade tão elevadas quanto às dos países mais desenvolvidos.

No Brasil, foi estimado uma incidência de mais de 49 mil novos casos de câncer de mama entre as mulheres para o ano de 2010, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (figura 2). Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco de 65 casos novos por 100 mil habitantes. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte é o segundo tumor mais incidente (17/100.000) (Ministério da Saúde / INCA, 2009).

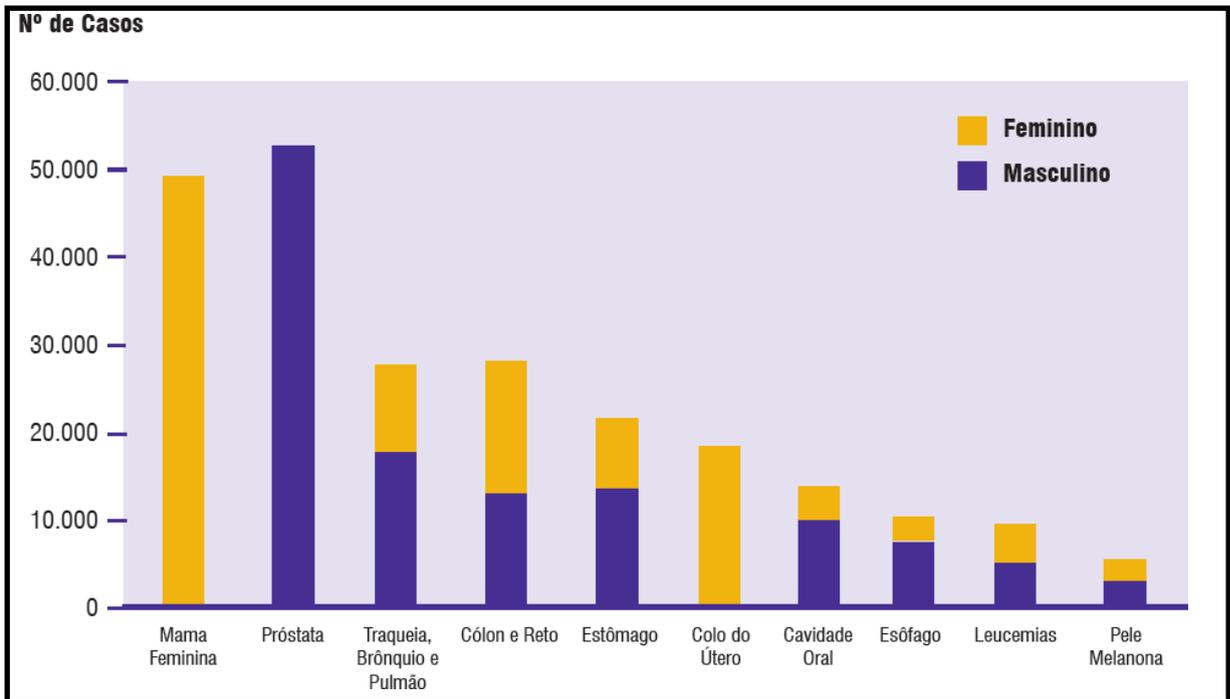
Figura 1: Incidência e mortalidade causada pelo câncer de mama no mundo



Fonte: Adaptado de Parkine colaboradores, 2005.

O câncer de mama masculino é considerado uma doença rara, com frequência de 1% dentre todos os casos (Comet et al, 2009). Assim, o principal grupo de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são as mulheres, sendo que fatores ambientais, sociais, culturais, raciais e genéticos influenciam no desenvolvimento da doença (Hankinson et al, 2004). No quadro 1 podemos observar como estes fatores podem aumentar ou diminuir o risco do desenvolvimento do câncer de mama.

Figura 2: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira



Fonte: Ministério da Saúde / INCA, (2009).

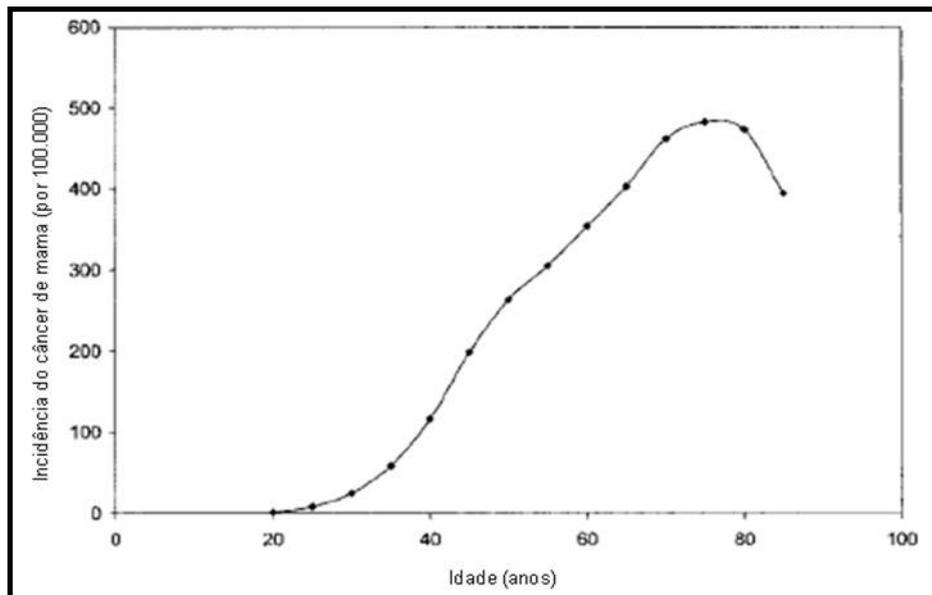
Quadro 1: Influencia de fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama

FATORES DE RISCO	RISCO
HISTÓRICO FAMILIAR OU PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA	AUMENTA
TUMOR DE MAMA BENIGNO	AUMENTA
PARIDADE	DIMINUI
MENOPAUSA TARDIA (>54 ANOS)	AUMENTA
NIVEIS ELEVADOS DE ESTROGÊNIO ENDÓGENO	AUMENTA
REPOSIÇÃO HORMONAL	AUMENTA
EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO IONIZANTE	AUMENTA
MENARCA PRECOCE	AUMENTA
CONSUMO DE ÁLCOOL	AUMENTA
CONTRACEPTIVOS HORMONAIIS	AUMENTA
ATIVIDADES FÍSICAS	DIMINUI

Fonte: Adaptado de Hankinson e colaboradores (2004)

Mulheres com idade mais avançadas apresentam maior risco do desenvolvimento da doença. Este fato se deve à perda progressiva da capacidade do organismo de reparar falhas no desenvolvimento e crescimento dos tecidos, sendo este reparo essencial para impedir a carcinogênese (Ries et al, 2000). Na figura 3 podemos observar um gráfico representando a variação da incidência do câncer de mama conforme a idade. Nele observamos um aumento proporcional da incidência de câncer de mama com o aumento da idade. A menarca prematura e menopausa tardia também apresentam-se como fatores de risco para o câncer de mama. Nestes dois eventos a mulher está sujeita a maior exposição a falhas nas transformações do endométrio e da mama durante os ciclos menstruais (Singletary, 2003).

Figura 3: Incidência do câncer de mama aumentando conforme a progressão da idade



Fonte: Adaptado de Ries, 2000.

Estudos indicam que a nuliparidade também se apresenta como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, pois com a ausência da gestação, os órgãos reprodutores femininos não se tornam totalmente maduros, principalmente as mamas, mantendo-se mais sujeitos a falhas durante os ciclos menstruais (Brinton et al, 1988). Além disto, mulheres com filhos apresentam melhores prognósticos quando desenvolvem a doença e melhor resposta ao tratamento (Black et al, 1983).

O tabagismo e o alcoolismo podem também influenciar o desenvolvimento de carcinoma mamário. Vários estudos evidenciam uma correlação entre o desenvolvimento do câncer de mama e o consumo moderado de álcool. Indivíduos que ingerem álcool em quantidade significativa podem apresentar alterações nos níveis de hormônios no sangue, principalmente o estrogênio (Zang et al, 2007).

A utilização de reposição hormonal, que também influencia diretamente nos níveis séricos de hormônios gonotróficos, 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 (Steimberg et al, 1991).

Hábitos alimentares, como o consumo de produtos industrializados, com utilização de conservantes, e outros produtos químicos também constituem fatores que podem influenciar o desenvolvimento do câncer de mama. O fato de ter desenvolvido câncer de mama no passado também apresenta-se como forte fator de risco para um novo tumor (Agrawal et al, 2008).

Algumas alterações genéticas podem atuar aumentando a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver câncer de mama, podendo elevar os níveis de desenvolvimento da doença em até 200 vezes (Singletary et al, 2003). Um bom exemplo de alterações genéticas são as mutações no gene *BRCA1*, localizado no cromossomo 17, que são amplamente encontradas em membros de famílias que apresentam histórico de câncer de mama (Baynes et al, 2007). O fato de famílias com casos de câncer de mama masculino não apresentarem mutações no gene *BRCA1* influenciou o desenvolvimento de novos estudos e levou a investigação de outros genes de suscetibilidade ao câncer e à identificação do gene *BRCA2* (Baynes et al, 2007).

Se a família possui mais de dois casos de câncer de mama diagnosticados em idade precoce e pelo menos dois casos de câncer de ovário, a probabilidade de detecção da mutação no gene *BRCA* é alta. Fatores preditivos de identificação de mutação incluem número de indivíduos afetados, idade de diagnóstico, ascendência judia e características patológicas (Greenblatt et al, 2001).

Certas mutações estão presentes em grupos étnicos, chamadas mutações fundadoras. Estas mutações são disseminadas por deriva gênica ao longo do tempo e se instalam em determinada população. Algumas mutações no gene *BRCA1*, encontradas em indivíduos judeus Ashkenazi, são um bom exemplo de mutações fundadoras. Durocher e colaboradores, em 1996, identificaram duas mutações recorrentes no *BRCA1* (185delAG, 5382insC) em uma série de famílias em Quebec, Canadá. Os autores descobriram que essas mutações estavam presentes em ancestrais judeus. Posteriormente, identificou-se outra mutação fundadora no

*BRCA2* (6174delT). Investigadores demonstraram que mulheres judias que não apresentam uma destas três mutações fundadoras dificilmente apresentam mutação no gene (Narod et al, 2004). Muitos pesquisadores acreditam que o teste genético em mulheres judias deva ser restrito a análise destas três mutações. Outras mutações fundadoras foram também identificadas em populações da Islândia e Polônia (Braczkowski et al, 1998).

Em aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama há a 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 (Labrie et al, 2003). Muitos tratamentos de combate ao câncer de mama utilizam antagonistas destes hormônios para assim bloquear seus receptores e impedir a sinalização de crescimento celular que eles proporcionariam. O tamoxifeno é um dos tratamentos mais eficazes neste aspecto e apresenta resultados satisfatórios em mais de 50% dos casos de tumores ER (“estrogen receptor”) positivos (Feldman et al, 2002).

Algumas mutações no gene do receptor de estrogênio, denominadas mutações ativadoras, podem desencadear a supersinalização por esses receptores sem a necessidade de ligação com seu agonista. Com isto, cascatas de divisões celulares se sucederão e as células estarão mais expostas a falhas na replicação do DNA (Sommer e Fuqua, 2001).

Terapias que utilizam antagonistas destes receptores ou estereotomia apresentam bons resultados quando os genes dos receptores não se encontram mutados. Entretanto, sempre se mantém no organismo concentrações residuais de estrogênio, o que leva ao aumento da expressão de seus receptores. Assim, com o tempo, estas terapias podem perder seu poder de ação e as células cancerígenas podem voltar a receber a sinalização do estrogênio.

Pacientes com tumores de mama positivos para receptores de estrogênio e de progesterona apresentam uma melhor sobrevida em relação à pacientes com tumores negativos para estes receptores, com média de sobrevida maior do que cinco anos em 83% dos pacientes receptores positivos e de 69% em pacientes receptores negativos (Grann et al, 2005). O perfil de expressão destas proteínas receptoras pode variar com o progresso da doença. Por exemplo, a expressão de receptor de estrogênio em tumores metastáticos mostrou-se diferente da que estava presente nos tumores primários em 20% dos casos analisados de tumores de mama (Kuukasjarvi et al, 1996). Em adição, a expressão de receptor de progesterona é perdida em 40% dos casos de tumores de mama quando estes se transformaram em metastáticos (Franco et al, 2004).

Outro relevante biomarcador em pacientes de câncer de mama é o receptor de fator de crescimento epitelial 2, chamado HER2 ("Human Epidermal growth factor Receptor-type 2"). A superexpressão desta proteína nas células pode desencadear uma proliferação celular acelerada e angiogênese, além da inibição de apoptose. Devido a isto, tumores HER2+ são mais agressivos e levam a um pior prognóstico, quando comparado a tumores HER2- (Smith et al, 2007).

### **Diagnóstico no câncer de mama**

Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do carcinoma de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (Sorlie, 2004). A classificação morfológica (anátomo-patológica) atualmente utilizada é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia (Reis-Filho et al, 2006). Acredita-se que as limitações na classificação morfológica são devidas à incapacidade de se considerar as características biológicas destes tumores (Sorlie et al, 2003).

Assim, tecnologias aplicadas nos estudos de DNA, RNA e do perfil das proteínas, podem ser utilizadas para retratar um fenótipo detalhado do tumor. A caracterização sistemática e detalhada dos tumores em uma escala genômica pode ser correlacionada com informações clínicas, contribuindo, desta forma, para aumentar o entendimento das causas e progressões do carcinoma e para capacitar a descoberta de novos marcadores moleculares, possibilitando intervenções terapêuticas (Bertucci et al, 2006).

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 unidade terminal ducto-lobular. Embora haja predominância de acometimento dos dutos 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 e de tipo lobular.

## **Carcinoma não-invasivo**

O carcinoma não-invasivo, ou *in situ*, é caracterizado pelo crescimento da formação tumoral dentro dos dutos da glândula mamária, sem que haja penetração da membrana basal do tecido e, portanto, sem a presença de células tumorais em dutos que proporcionariam a invasão do estroma. O carcinoma *in situ* é subdividido em duas categorias: carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS).

O carcinoma ductal *in situ* é muitas vezes subdividido pela presença ou ausência de comedonecrose. O carcinoma ductal endócrino *in situ* é um padrão de crescimento variante do carcinoma ductal *in situ*, onde o arranjo das células sugere uma estrutura endócrina. Este é um termo descritivo que carece de significado clínico ou prognóstico.

O carcinoma lobular *in situ* é caracterizado pela distensão dos dutos lobulares por uma população de células uniformes e desconectas que não apresentam pleomorfismo nuclear, nucléolos e atividade mitótica. Estudos evidenciam que a sua presença pode ser considerada como um indicador de aumento do risco relativo para o paciente desenvolver carcinoma mamário invasivo.

## **Carcinoma invasivo**

É caracterizado pela penetração neoplásica da membrana basal de um duto apresentando carcinoma *in situ* e pela extensão dos agregados celulares neoplásicos no estroma mamário.

### **Carcinoma ductal infiltrante (CDI)**

Compreende cerca de 75% de todos os tumores de mama invasivos. A designação de carcinoma ductal refere-se à crença de que este tipo de carcinoma origina-se nos dutos da glandula mamária. Este padrão de crescimento neoplásico pode ser associado a tumores não invasivos como o carcinoma lobular *in situ* ou carcinoma ductal *in situ*.

### **Carcinoma lobular infiltrante**

O carcinoma lobular invasor representa 10% dos carcinomas invasores de mama e tem bom prognóstico, com sobrevida de 10 anos em 80-90% das pacientes. As variantes histológicas são os subtipos alveolar, sólido, pleomórfico e formas mistas.

### **Carcinoma Mucinoso (colóide)**

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.

### **Carcinoma medular**

O carcinoma medular é uma forma de carcinoma ductal invasivo caracterizado por um padrão de crescimento limitado, acentuado pleomorfismo nuclear e atividade mitótica.

### **Carcinoma papilar**

Pode se referir a um carcinoma invasivo ou não, estando esta característica relacionada ao resultado do crescimento papilar. Uma neoplasia papilar não-invasiva está presente dentro de um ducto dilatado, e é muitas vezes ligado a mais de um local na parede do ducto.

### **Carcinoma tubular**

É uma forma bem diferenciada do carcinoma de mama invasivo. O carcinoma geralmente apresenta-se associado a focos de carcinoma ductal *in situ* e é caracterizado microscopicamente pela presença de pequenos dutos angulados uniformes que invadem o estroma mamário.

### **Carcinoma adenóide cístico**

Carcinoma adenóide cístico é caracterizado pela baixa presença de células invasivas, apresentando um crescimento celular na forma de cilindros, contendo mucina e rodeado tanto por células epiteliais quanto por mioepiteliais.

### **Carcinoma com metaplasia**

Embora os focos de mudança metaplásicos não sejam incomuns no carcinoma ductal invasivo, alguns tumores consistem quase inteiramente de um único padrão de crescimento. As metaplasias são tipicamente circunscritas e preferencialmente se apresentam em mulheres pós-menopáusicas.

## **Classificação histopatológica no câncer de mama**

O sistema de classificação TNM (Tumor-Nódulo-Metástase) foi desenvolvido por Pierre Denoix entre os anos de 1942-1952 e representou uma tentativa de classificar o câncer baseado nos mais importantes atributos morfológicos de tumores malignos que influenciariam o prognóstico da doença: tamanho do tumor primário (T), comprometimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M). A UICC (União Internacional Contra o Câncer) apresentou uma classificação do câncer de mama baseado no sistema TNM em 1958, e o AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) publicou um sistema de estadiamento de câncer de mama, também baseado no TNM, no seu primeiro manual de estadiamento em 1977. No mesmo ano, uma revisão eliminou as diferenças entre os sistemas TNM do AJCC e da UICC, conforme resumido no quadro 2 (Singletary et al, 2006).

No quadro 3, estão descritos os estadiamentos TNM para o câncer de mama, o qual é baseado no conjunto de todos os valores do sistema de classificação TNM. Quanto maior for o estadiamento TNM, menor o percentual de chance de sobrevivência global de 10 anos de um indivíduo, como mostra a figura 4.

Quadro 2: Classificação TNM resumida para o câncer de mama de acordo com o manual de estadiamento da AJCC 6ª-Edição

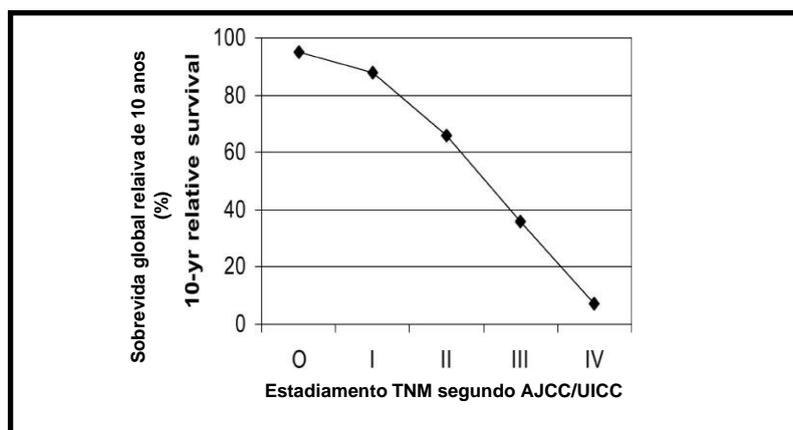
<b>Classificação</b>	<b>Definição</b>
<b>Tumor primário (T)</b> TX T0 Tis T1 T1a T1b T1c T2 T3	Tumor primário não acessado Sem evidência de tumor primário Carcinoma in situ Tumor $\leq 2$ câncer de mama em sua maior dimensão Tumor $> 0,1$ câncer de mama, porém $\leq 0,5$ câncer de mama em sua maior dimensão Tumor $> 0,5$ câncer de mama, porém $\leq 1$ câncer de mama em sua maior dimensão Tumor $> 1$ câncer de mama porém $\leq 2$ câncer de mama em sua maior dimensão Tumor $> 2$ câncer de mama porém $\leq 5$ câncer de mama em sua maior dimensão Tumor $> 5$ câncer de mama em sua maior dimensão
<b>Linfonodo regional (N)</b> NX N0 N1 N2 N2a N2b N3	Linfonodo não pode ser acessado Sem metástase no linfonodo Metástase no linfonodo axilar ipsilateral móvel Metástase no linfonodo axilar ipsilateral fixo Metástase no linfonodo axilar ipsilateral fixo a outro ou outras estruturas Metástase somente em linfonodos mamários internos ipsilaterais definidos por exame clínico Metástase nos linfonodos infraclaviculares ipsilaterais
<b>Metástase (M)</b> MX M0 M1	A distância da metástase não pode ser avaliada Sem metástase Metástase

Fonte: Adaptado de Singletary et al(2006).

Quadro 3: Estadiamento TNM Estadiamento TNM para o câncer de mama adaptado do manual de estadiamento da AJCC 6ª-Edição, 2002.

Estadiamento TNM	Descrição
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0 T1 N1 M0
IIB	T2 N0 M0 T2 N1 M0 T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
IIIC	Qualquer T N3 M0
IV	Qualquer T Qualquer N M1

Figura 4: Sobrevida global relativa de 10 anos associada com o estadiamento TNM pela AJCC/UICC



Fonte: Adaptado de Bland et al, 1998. Foram analisados 1.300.000 casos obtidos através do Banco de Dados Nacional do Câncer nos EUA, entre os anos de 1985 e 1996. O estadiamento II inclui os subtipos IIA e IIB e o estadiamento III inclui os subtipos IIIA, IIIB e IIIC.

Até recentemente, as graduações histológicas mais comumente utilizadas nos Estados Unidos eram o sistema original SBR (Scarff-Bloom-Richardson) e o método Black, que enfatiza a graduação nuclear e não considera túbulos como critério (Black et al, 1955). Na Europa, o sistema SBR modificado por Elston-Ellis (sistema Nottingham) é o preferido e está sendo cada vez mais utilizado nos EUA (Simpson et al, 2005).

O grau de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico são parâmetros utilizados para a graduação histológica do sistema de Scarff-Bloom- Richardson modificado por Elston-Ellis, com importante valor prognóstico.

O estudo do perfil molecular do carcinoma de mama vem mostrando um importante avanço a partir da identificação dos perfis de expressão gênica que foram baseados em estudos com cDNA *microarrays* em mais de 8.000 genes humanos pertencentes a 42 pacientes (Perou et al, 2000). Subseqüentes análises mais refinadas foram realizadas em modelos propostos por outros pesquisadores e foi possível distinguir os subtipos tumorais e os atuais conceitos em que se baseia a classificação molecular, correlacionando os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos relevantes, como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença (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*.

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, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado a pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (Eisenberg et al, 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<sup>2</sup>. De acordo com as mais recentes publicações, 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 *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).

### **Aspectos moleculares no câncer de mama**

Na vida de um organismo complexo como o humano, a renovação tecidual é muito importante para a manutenção da homeostase. Esta renovação é importante pelo fato das células perderem com o tempo a capacidade de desempenhar com total capacidade suas atividades. Em adição a isto, muitas vezes as células são alvo de agentes genotóxicos e mutagênicos, o que indica a elas a necessidade de programar sua morte, a apoptose.

Várias vias protéicas atuam na tentativa de preservar a integridade de uma célula, uma vez que reparar um erro custa menos ao organismo que gerar uma nova célula. Para isto, proteínas de reparo do DNA atuam reparando possíveis falhas presentes no código de diferentes sequências do genoma, falhas estas que podem ser ocasionadas pelos tais agentes genotóxicos e mutagênicos ou por erro na replicação do DNA. Quando as vias de reparo do DNA não atuam corretamente há, então, a necessidade de se acionar as vias apoptóticas.

Em nosso genoma existe uma série de genes supressores de tumor, que expressam proteínas que atuarão impedindo que células defeituosas possam progredir e se dividir. Estas proteínas são muito importantes para preservar a integridade de um tecido e apresentam grande influência no impedimento da formação tumoral (Vogel, 1979). Podem atuar também contra a ação de oncogenes, seja na promoção da parada do ciclo celular ou através do desencadeamento da apoptose.

Por outro lado, o genoma humano também apresenta os proto-oncogenes, que expressam proteínas que atuam na promoção do crescimento e divisão celular. Quando mutadas ou superexpressas, estas proteínas podem atuar de forma acelerada, desencadeando

múltiplas divisões celulares sem que haja uma revisão do DNA nas células filhas. Assim, erros de pareamento e mutações tem maiores probabilidades de ocorrer e, com eles, células com fenótipo mutante podem ser formadas. Desta forma, os oncogenes podem influenciar a sinalização de crescimento e divisão celular e vias de sinalização antiapoptóticas. A ação destas proteínas é essencial para desencadear a formação tumoral (Deng et al, 2010).

Mutações deletérias em genes de supressão tumoral podem impedir a ação correta do produto destes genes o que aumentará a probabilidade do desenvolvimento tumoral (Vogelstein e Kinzler, 1993).

Uma terceira classe de proteínas que atuam no contexto do desenvolvimento de tumores são as proteínas codificadas pelos genes de reparo do DNA. Seus produtos apresentam grande importância na manutenção da integridade do código genético da célula. A importância destes genes foi descoberta quando observou-se a correlação entre a presença de mutações em sequências de genes que codificam proteínas do sistema de reparo do emparelhamento errôneo do DNA (MMR – “mismatch repair”) e o câncer colorretal não-poliposo hereditário (Liu et al, 1995).

### **Instabilidade genômica em microssatélites**

Os microssatélites são sequências repetitivas curtas em tandem (STR - “*short tandem repeats*”), variando o tamanho da sequência de 2 a 6 pares de bases. No início dos anos 90, foram descritos aproximadamente 200.000 *loci* STR triméricos ou tetraméricos, espalhados pelo genoma humano, sendo a ocorrência deles no cromossomo X humano a cada 300 a 500 kb. Essa distribuição parece ocorrer também por todo o genoma, podendo estar presentes em regiões codificantes ou não. Se ocorrerem em regiões transcritas, provavelmente estarão presentes em íntrons ou em regiões flangeadoras da transcrição gênica (Edwards et al, 1991).

As instabilidades em microssatélites afetam de maneira drástica genes como *TGF $\beta$ RII*, *IGF-2R* e *BAX* que apresentam STRs em suas regiões codificantes (Loeb e Monnat, 2008). Estes genes citados estão diretamente relacionados ao controle do crescimento celular e da apoptose.

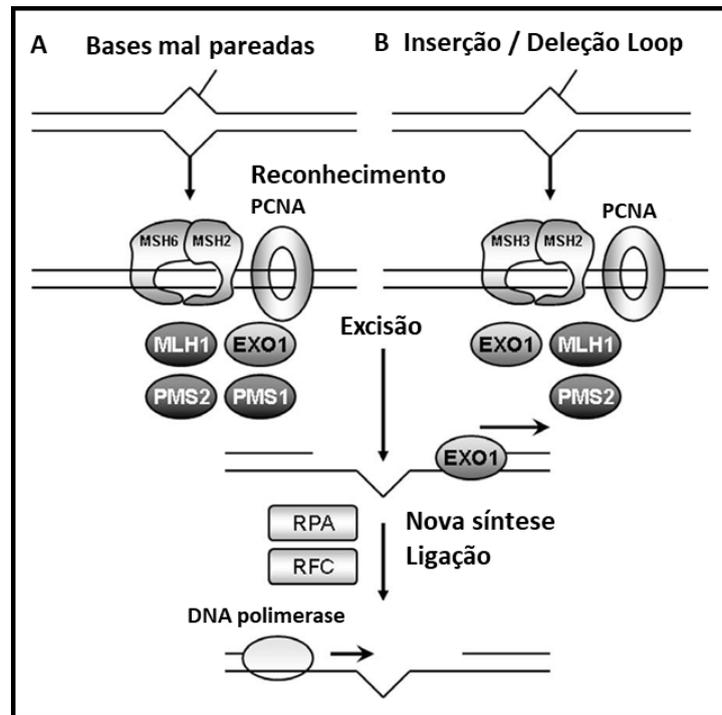
Um dos principais sistemas de reparo do DNA nas células humanas é o MMR (“mismatch repair”). Sua atuação consiste no reparo de bases mal-pareadas e de largas inserções/deleções. Mutações e silenciamento epigenético nas proteínas membros do MMR estão associados ao aumento da instabilidade genética (Hakem, 2008). Uma característica

inerente às células tumorais que apresentam mutações em genes do sistema de reparo MMR é a presença de instabilidade genômica (Aguilera et al, 2008). Devido ao malpareamento das bases, as sucessivas replicações do DNA e a não reparação dos erros, o genoma acumula falhas que podem ser tanto de ganho de material genético, com alterações de genótipos e de estrutura de genes, como de perda de DNA, por deleções e falhas da DNA polimerase na leitura do DNA molde (Conde et al, 2009).

Durante a síntese de DNA, os iniciadores e a fita molde de DNA apresentando microssatélite podem ocasionalmente se desassociar e se reanelar de maneira errônea devido a presença de repetições nucleotídicas presentes nos STRs. Este fato pode gerar uma molécula heteroduplex de DNA e o número de repetições em tandem presentes na fita recém sintetizada pode diferir da pertencente à fita molde, formando os IDLs – “loops” de inserção/deleção. Quando a DNA polimerase não consegue reconhecer e reparar o erro no momento da replicação, as IDLs são endereçadas para o sistema MMR. O sistema MMR atua degradando a seção da fita de DNA que contém o erro e recruta a DNA polimerase para novamente gerar o fragmento correto (Hakem et al, 2008, Andrew et al, 2009). Na figura 5 temos uma representação esquemática de como o sistema MMR executa o reparo na cadeia de DNA.

Assim, portanto, as instabilidades em microssatélites podem ser analisadas como sinalizadores de estágios do tumor e podem ser utilizadas, em alguns casos, como marcadores de prognóstico para o tratamento da doença.

Figura 5: Atividade do sistema de reparo MMR.



A ação do MMR é iniciada quando os heterodímeros MutSa ou MutSb reconhecem e se ligam a um pareamento incorreto de bases. A: MutSa reconhece e se liga a bases pareadas erroneamente. B: MutSb reconhece e se liga a loop de inserção / deleção. Heterodímeros de MutL homólogos, como hMLH1-hMLH3 e PMS1 e PMS2, bem como EXO1, RPA, RFC e DNA polimerase são também recrutados ao complexo para completar a excisão da falha na cadeia de DNA e a síntese da nova fita e a ligação. Adaptado de Martin e colaboradores, 2010.

Esta via de reparo de DNA é evolucionariamente bem conservada e muito do que se sabe sobre o sistema MMR humano foi observado em estudos com *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (Kunkel e Erie, 2005). Entretanto, a importância do mau funcionamento do sistema MMR humano somente pode ser observada em sistemas de mamíferos, nos quais se verificou que as proteínas do sistema MMR também atuam nas vias de metabolismo do DNA e organização estrutural da fita de DNA para sinalização de danos aos processos de recombinação genética (Hsieh et al, 2000).

### **Gene de reparo *hMLH1***

O gene *hMLH1* foi identificado como um *locus* frequentemente mutado em câncer coloretal não-poliposo (Bronner et al, 1994), com uma frequência de mutação de aproximadamente 90% dos pacientes com câncer coloretal hereditário não-poliposo (Sengupta et al, 2007). O gene *hMLH1* está localizado no cromossomo 3, 3p21.3, apresenta aproximadamente 60 kb e codifica uma proteína de 756 aminoácidos. O produto deste gene é uma proteína homóloga a MutL de *E. coli*. A proteína MutL é uma ATPase e somente atua quando há a formação de um homodímero. Sua atividade consiste no reconhecimento de pareamento errado de bases, o qual acarreta a remoção do fragmento da sequência de DNA contendo o erro.

A proteína hMLH1 em humanos exerce sua função no reparo do DNA quando presente em um heterodímero com a proteína PMS2 (Li et al, 2008). Este complexo protéico é denominado MutL $\alpha$  e atua como uma endonuclease. Subsequente à atividade da excisão das bases pareadas erroneamente, a exonuclease EXO1 participa removendo as bases (Mastrocola et al, 2009). Na figura 5 pode-se observar a representação da atuação da hMLH1.

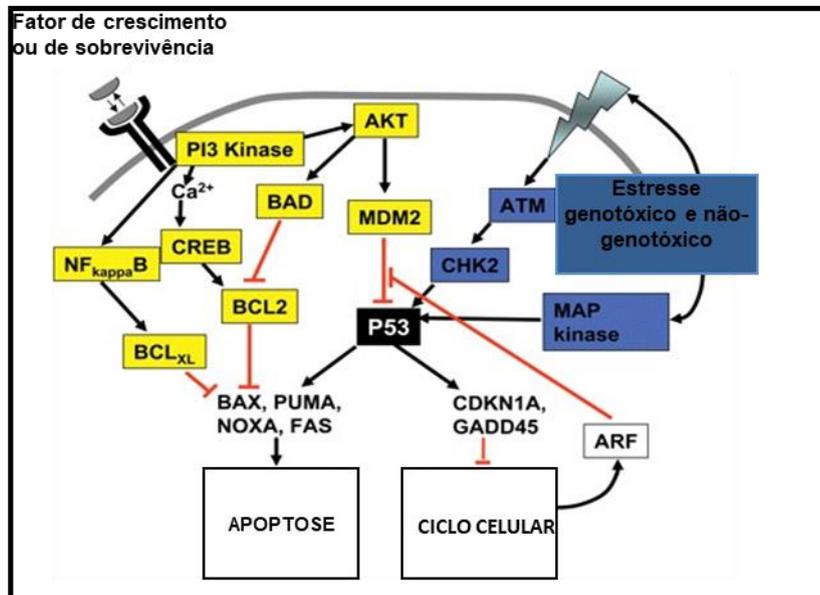
Estudos sobre o gene de reparo *hMLH1* tem mostrado que ele se encontra alterado em diversas formas tumorais. Hipermetilação da região promotora e mutação de sua cadeira gênica são as principais vias de inibição da transcrição deste gene (Naqvi et al, 2008). A associação entre mutação e hipermetilação da região promotora do gene é um dos principais responsáveis pelo fenômeno de instabilidade em microssatélite (Duriseti et al, 2006).

### **Gene supressor de tumor *TP53***

Quando tratamos de câncer não podemos deixar de citar o gene *TP53*. Este gene foi descrito em 1953 como um oncogene, sendo posteriormente classificado como um gene supressor de tumor. O *locus* da proteína supressora de tumor 53 (TP53) está localizado no cromossomo 17, na posição 17p13.1 (Isobe et al, 1986). O gene apresenta 19 Kb e contém 11 éxons. Desses 11 éxons, o primeiro não é transcrito.

A proteína p53, de 53 kDa e 393 aminoácidos, é uma fosfoproteína nuclear. A ativação da p53 acontece por estresse celular, como danos ao DNA e estresse oncogênico (Stiewe, 2007). A figura 6 apresenta um esquema de ativação e atuação da proteína supressora de tumor p53 e o seu papel na indução da apoptose.

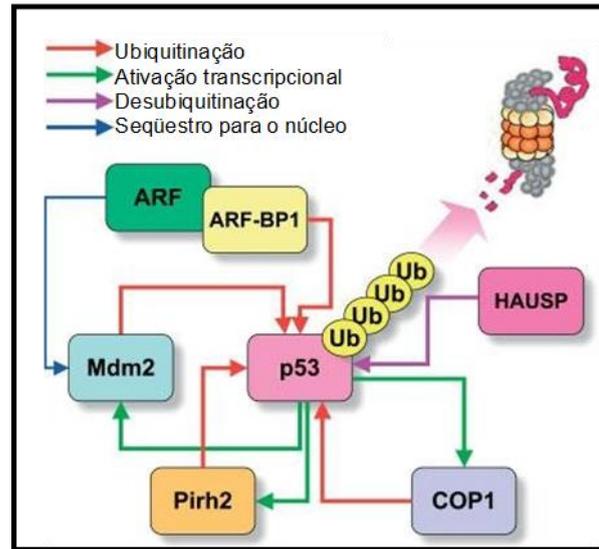
Figura 6: Esquema simplificado ilustrando a atividade da proteína supressora de tumor p53 na indução à apoptose



O processo de indução à apoptose é altamente complexo e necessita da atuação de muitas proteínas. Simplificadamente, pode-se destacar que a partir de uma quebra na sequência de DNA a proteína de reconhecimento ATM aciona a proteína de checagem do ciclo celular Chk1/2, esta por sua vez recruta p53 que poderá desempenhar sua função induzindo a apoptose diretamente, ou atuando como fator de transcrição ou mesmo interagindo com proteínas da cadeia de caspases. Adaptado de Hollstein e Hainant, em 2010.

Muitos estudos sobre o gene da TP53 nas últimas três décadas revelaram uma rede complexa de fatores que regulam o desempenho da proteína. Dentre alguns destes fatores, podemos citar a presença de mais de uma região promotora em seu gene e regiões de splicing alternativo. Devido a isto, mais de dez isoformas da proteína p53 foram identificadas (Murray-Zmijewski et al, 2006). Verificando a atividade das alterações pós-traducionais no controle da atividade da p53, a atividade da proteína varia conforme sua concentração no meio intracelular, variações estruturais, localização intracelular, ligação ao DNA e interação com outras proteínas. A concentração da proteína na célula e sua ativação são reguladas por um padrão de modificações pós-traducionais, como por exemplo, fosforilação, acetilação, ubiquitinação, metilação e glicosilação (figura 7). A proteína Mdm2, um regulador negativo da p53, é o principal controlador dos níveis de p53 na célula e de sua localização subcelular. Enzimas que realizam as modificações pós-traducionais na p53 também desempenham grande importância na regulação da atividade da proteína, pois sem essas modificações a proteína não consegue realizar sua atividade de reconhecimento de sequências de DNA e de interação da p53 com cofatores transcripcionais de promotores de genes alvo (Hollstein e Hainant, 2010).

Figura 7: Vias de regulação da proteína p53



Fonte: Adaptado de Hollstein e Hainant, 2010. As principais vias de controle da atividade da proteína p53 estão representadas na figura, como por exemplo a atuação da proteína ARF impedindo a ação de Mdm2 e a indução de degradação da p53 por ubiquitinação.

A p53 pode ser ativada por uma quebra simples na dupla fita de DNA ao longo do genoma. A presença da quebra simples na sequência de DNA é suficiente para aumentar os níveis de p53 na célula. Neste caso de ativação, a p53 ativa a proteína ATM quinase, a qual fosforila a p53, impedindo que a proteína sofra ubiquitinação. Uma segunda via se inicia quando outros danos no DNA, como os causados por quimioterapia e radiação UV ocorrem. Essa via leva à ativação da caseína quinase II (CKII), também desencadeando a fosforilação da p53. Uma terceira via de ativação da p53 é acionada por anormalidades nos níveis de fatores de crescimento, o que desregula o ciclo celular. A terceira via não necessita de quinases para intermediar a indução do aumento dos níveis de p53. Outras vias de ativação e controle dos níveis de p53, como estresse fisiológico e hipóxia, ainda necessitam de maiores estudos (Cosse et al, 2009).

Dependendo do ponto do ciclo celular em que ocorre a ativação da proteína p53, ações diferentes podem ser desencadeadas. Se a ativação se der na fase G1, o ciclo celular será interrompido, e assim também a multiplicação celular, até que o dano no DNA ou algum outro tipo de estresse celular seja reparado. Se a ativação se der após a fase de síntese, a célula será programada para a morte (Cheng et al, 2010).

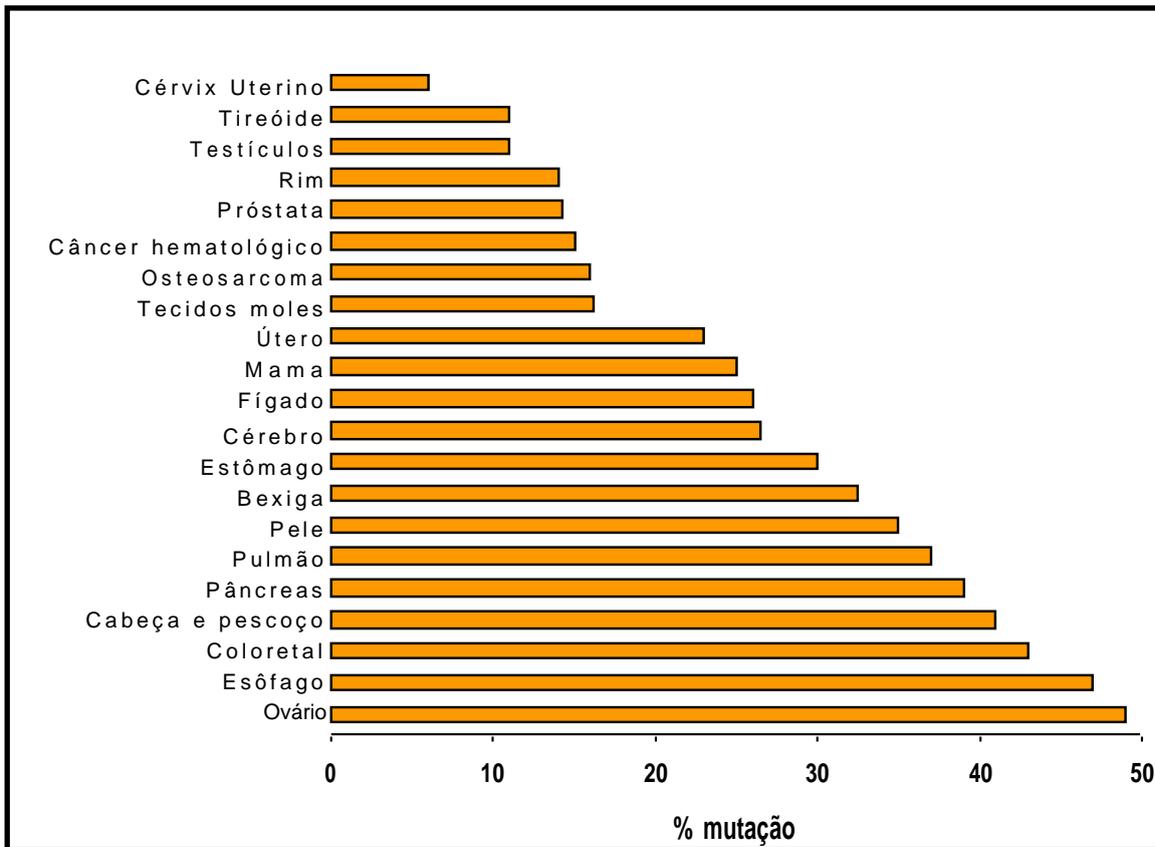
A p53 pode atuar como fator de transcrição, ligando-se pelo seu domínio central a sequências específicas do DNA, podendo ativar três vias distintas: inibição do ciclo celular, ativação de proteínas de reparo e apoptose. Também participa do reconhecimento de danos no

DNA pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), agindo como fator de acessibilidade ao DNA para o NER (Adimoolan et al, 2003) e modulando as atividades de proteínas deste sistema de reparo como XPB e XPD (Dregoes e Rainbow, 2009). Além disso, atua na regulação da expressão das proteínas DDB2, responsáveis pela ligação da maquinaria de NER ao DNA e XPC, que agem no reconhecimento de erros na fita de DNA no NER (Rubbi et al, 2003).

Exercendo sua atividade na via apoptótica, a p53 desempenha função na regulação de genes chave para o desencadeamento da morte celular programada. Promove a ativação de famílias de genes pró-apoptóticos como *Bcl-2*, *Bax*, *PUMA*, *Bid* e *Noxa*, que ativarão a despolarização da membrana mitocondrial e inibe a atividade de proteínas anti-apoptóticas através de ligação direta à elas. Estas proteínas impediriam a liberação do citocromo C e o início da cascata de caspases (Wäster et al, 2009).

Mutações no gene da proteína p53, 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. Normalmente, as mutações que acometem o gene *TP53* são do tipo “missense”. Esse tipo de mutação leva a uma alteração de aminoácidos devido à troca de uma base nitrogenada na sequência de um códon. Células com mutações significativas no gene *TP53* perdem a função supressora de tumor da proteína p53, mas ainda há outras vias de proteção contra a formação tumoral, existindo outras proteínas com ação contra o estresse oncogênico. Weinberg (2006) mostra que a taxa de mutação no gene *TP53* varia de 10 - 50% em diversos tipos de tumor (Figura 8). Estudos correlacionando mutações no gene *TP53* e carcinomas mamários mostram que aproximadamente 25% dos tumores de mama apresentam mutação no gene *TP53* (IARC, 2009). 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).

Figura 8: Gráfico apresentando a porcentagem de mutação do gene TP53 nos principais tipos de câncer



Fonte: Figura adaptada de Weinberg, 2006.

### Gene supressor de tumor *CHD5*

A proteína CHD5 (“Chromodomain helicase DNA-binding”) é uma enzima remodeladora de cromatina-ATP dependente. Sua atividade consiste em remodelar a cromatina para permitir a transcrição ou não de um gene. Pertence a subfamília de helicases Swi-Snf-like e apresenta dois cromodomínios amino-terminais para interação com caudas de histonas metiladas da cromatina. Estas proteínas apresentam uma alta conservação evolucionária, entretanto pouco se sabe de sua ação no controle da expressão de proteínas. Apesar do pouco conhecimento, é sabido que a ação desta família de enzimas é muito importante para o correto enovelamento da cromatina (Fujita et al, 2008).

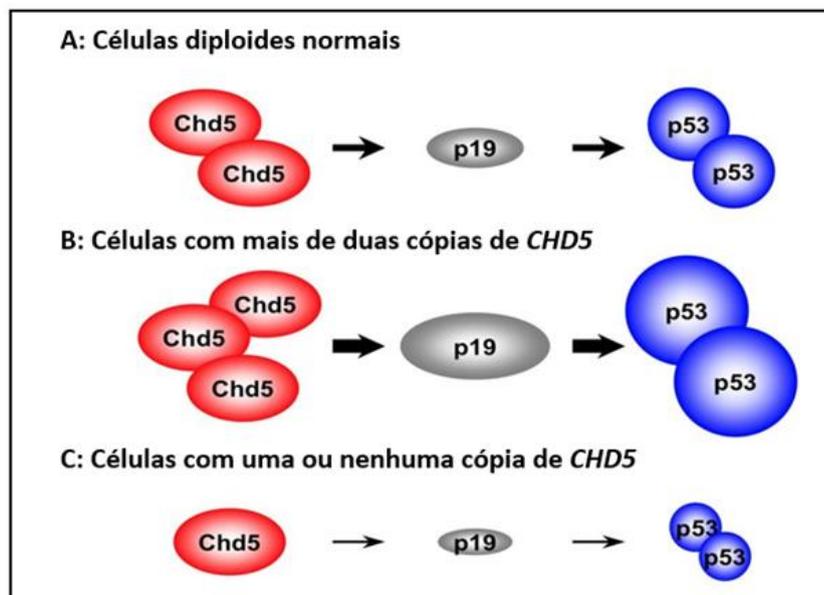
O gene *CHD5* está presente no cromossomo 1, posição 1p36. Esta região cromossômica vem sendo alvo de muitos estudos desde a década de 1970 em análises sobre câncer, mas não se sabia qual gene nesta região do genoma estaria intrinsecamente envolvido.

Deleções no braço curto do cromossomo 1 tem se apresentado frequentes em tumores epiteliais, neurais, hematopoiéticos, assim como tumores de mama (Bagchi et al, 2007).

Recentes estudos indicam que o CHD5 apresenta atividade supressora de tumor, interagindo em vias clássicas de proteção tumoral, como p16/Rb e p19ARF/p53. Propõem-se que a atividade do CHD5 aumenta a expressão de p19 e p16 (Wang et al, 2009). Estas vias estão relacionadas à parada do ciclo celular, parada da proliferação celular e apoptose. Bagchi e colaboradores (2007) mostraram que a ação de p53 foi aumentada com a inserção do *locus* contendo o gene CHD5 no genoma de células *in vitro* e a função da p53 foi prejudicada quando uma das duas cópias do gene *CHD5* foi deletada. Neste caso houve um aumento da transformação oncogênica das células.

Na figura 9 temos uma representação de como o aumento ou diminuição de cópias do gene *CHD5* podem influenciar a atividade de supressão tumoral da proteína p53. Deleções deste gene são muito recorrentes em neuroblastomas e, devido a isto, os principais trabalhos com o *CHD5* apresentam enfoque em tumores neurais. Trabalhos recentes mostram a inativação deste gene por alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, em diversos tipos tumorais, incluindo cólon, ovário e mama (Mulero-Navarro e Esteller, 2008).

Figura 9: Influência do *CHD5* sobre a atividade da proteína p53



Experimentos publicados por Bagchi e colaboradores em 2007 mostraram que variações na expressão de CHD5 podem implicar em variação na atividade da p53: **A:** Células normais, diplóides para *CHD5* leva a uma ação normal da proteína p53 com interação pela proteína p19. **B:** Duplicação do gene *CHD5* pode proporcionar uma amplificação na atividade da proteína p53 devido a um aumento na expressão de p19. **C:** Células com uma cópia ou “knockout” para *CHD5* apresentam atividade de p53 prejudicada.

## **Alterações epigenéticas do DNA**

A organização estrutural da cromatina é um importante modulador da regulação da expressão gênica. Modificações químicas no DNA e nas proteínas associadas à estrutura da cromatina, particularmente histonas, apresentam grande influência nesta estrutura e, portanto, na expressão gênica.

A hipoacetilação de histonas se apresenta como um bom marcador na deficiência de atuação de genes supressores de tumor e genes de reparo do DNA. Sem a presença de radicais acetil na cauda N-terminal das histonas, a cromatina se mantém inacessível para que ocorra a transcrição gênica e assim a proteína que atuaria na manutenção da integridade da célula e / ou do DNA não é expressa.

Estudos recentes mostram uma caracterização epigenética no câncer. Estes trabalhos evidenciam que os processos epigenéticos podem estar correlacionados com os estágios iniciais da transição de células normais para tumorais na carcinogênese. Nas etapas iniciais dos principais tipos tumorais estudados, como por exemplo câncer coloretal, pulmonar e de mama, um grupo das células pré-malignas começam a apresentar alterações genéticas e epigenéticas que permitem a elas progredir à forma tumoral. As variações epigenéticas que ocorrem nestas células podem determinar as subseqüentes variações genéticas, o que poderá desencadear a progressão dos clones celulares (Baylin et al, 2005). Assim, o acompanhamento do desenvolvimento de uma célula tumoral deve ser feito observando e estudando o epigenoma desta célula e a presença de mutações em seu genoma.

## **Metilação do DNA**

Nas células animais, o DNA pode sofrer um processo denominado metilação de citosinas, processo que somente ocorre em citosinas ligadas a guaninas na mesma fita de DNA, formando complexos CpG (Cedar et al, 2009). O padrão de metilação do DNA genômico é desfeito durante o desenvolvimento do zigoto, quando o animal está no estágio de mórula e é restabelecido no momento de implantação do embrião.

A metilação do DNA ocorre por ação de proteínas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), que adicionam um radical metil na posição 5' de uma citosina do complexo CpG. O complexo dinucleotídico CpG está disperso por todo o genoma, sendo regiões ricas em CpG denominadas ilhas CpG. Aproximadamente metade dos genes do genoma humano estão associados a ilhas CpG dentro de suas regiões promotoras. Estas

regiões normalmente se apresentam hipometiladas. A metilação das ilhas CpG ocorre principalmente em regiões não codificantes do genoma ou em células de tecidos somáticos.

### **Metilação do DNA e câncer**

Alterações no padrão de metilação do DNA resultam em produtos gênicos modificados, incluindo proteínas reguladoras do ciclo celular, receptores de esteróides e de moléculas de adesão celular, o que pode proporcionar às células tumorais maior capacidade de desenvolvimento e crescimento e de invadir novos tecidos (Wischniewski et al, 2006).

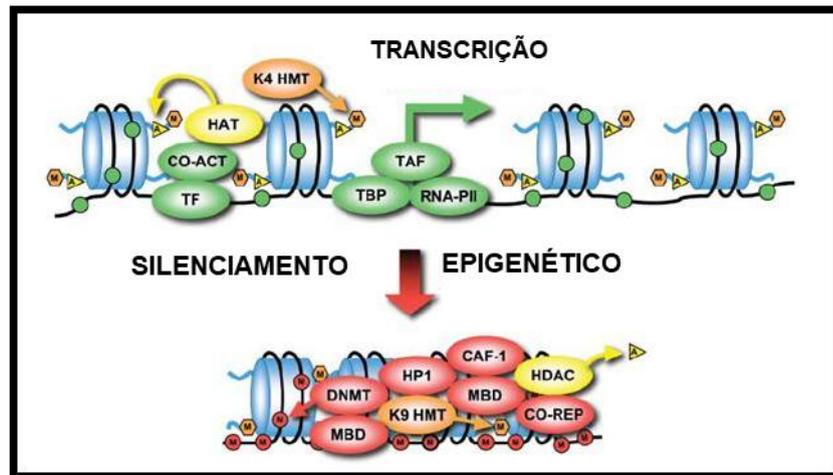
A hipometilação global do DNA comumente acarreta em instabilidade genômica, podendo aumentar a probabilidade de desenvolvimento de câncer, o que já foi bem estabelecido em modelos *in vivo* e *in vitro* (Eden et al, 2003; Holm et al, 2005). Células malignas podem apresentar perda de 20 a 60% de citosinas metiladas no genoma em relação às células normais (Esteller et al, 2001). A perda destas citosinas metiladas acarreta no aparecimento de hipometilação de genes (exons e íntros) e de sequências repetitivas presentes no genoma. O padrão genoma hipometilado pode acelerar todas as etapas da carcinogênese, desde as proliferações iniciais até formações cancerígenas invasivas (Fraga et al, 2004).

Três mecanismos podem atuar na carcinogênese a partir da hipometilação global do DNA: instabilidade cromossômica, reativação de transposons e perda do “imprinting” do DNA. Baixos níveis de metilação no DNA podem favorecer a recombinação mitótica, levando à perda de heterozigose, bem como promovendo rearranjos no cariótipo. Em adição a isto, perda de metilação em sequências centroméricas são fundamentais para o aparecimento de aneuploidia (Cai et al, 2007).

A hipometilação global do DNA de células tumorais também pode reativar DNA intragenômico silenciado, desde LINES (“long interspersed nuclear elements”) a repetições Alu. Esses transposons podem migrar de uma região inativa do genoma para outra com atividade transcricional, proporcionando uma perturbação no genoma da célula (Yoder et al, 1997).

Em contraste a isto, existe o fenômeno denominado metilação gene-específica, que consiste na presença de hipermetilação na região promotora de um gene. A presença de radicais metil acarreta no recrutamento de proteínas de ligação ao radical metil (MBD - “methyl-binding proteins”), incluindo proteínas histona-deacetilases, que impedirão a transcrição do gene, como mostra a figura 10.

Figura 10: Silenciamento gênico por ação da metilação do DNA

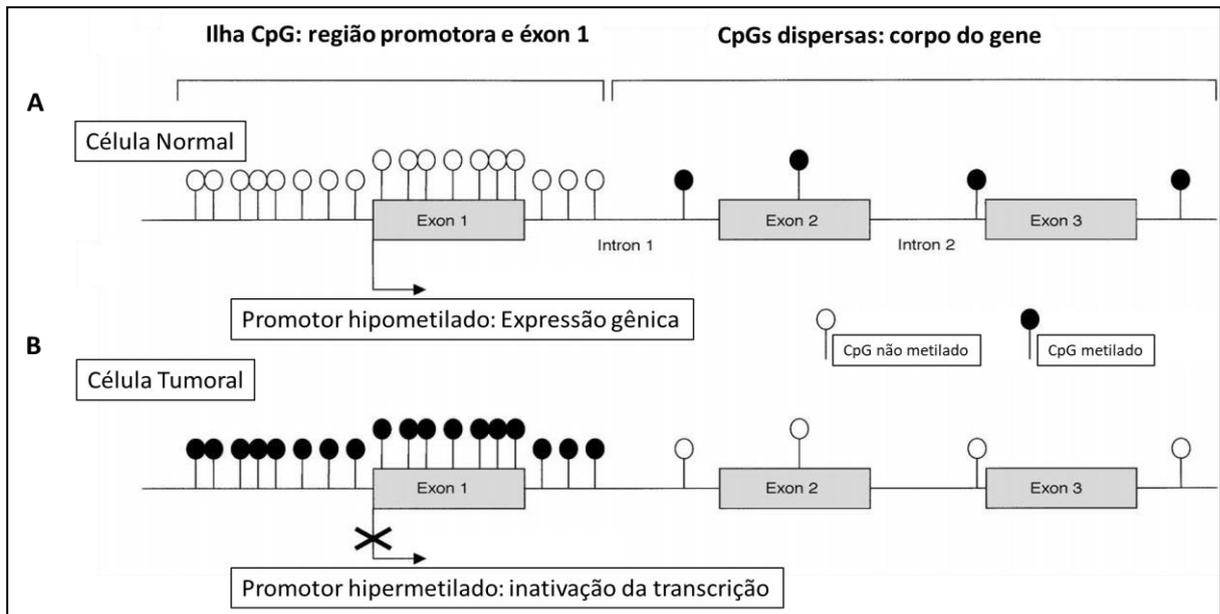


Recrutamento de proteína de ligação ao radical metil (MBD - “methyl-binding proteins”), incluindo proteínas histona-deacetilases, que impedirão a transcrição do gene.

Fonte: Adaptado de Laird, 2005.

As ilhas CpG localizadas na região promotora de genes supressores de tumor normalmente encontram-se hipometiladas pois estes genes precisam estar potencialmente preparados para serem expressos quando houver necessidade. Entretanto, em algumas células tumorais as ilhas CpG podem se apresentar hipermetiladas, o que acarretará no silenciamento gênico (Esteller et al, 2001), como esquematizado na figura 11. Nem todos os genes apresentam ilhas CpG em suas regiões promotoras e por isso não podem ser silenciados por metilação. Também não são todos os genes supressores de tumor silenciados epigeneticamente em todas as formações tumorais. Existe uma especificidade aparente, que leva em consideração o tecido de origem do tumor e o gene silenciado (Costello et al, 2000).

Figura 11: Inativação da transcrição gênica devido à hipermetilação da região promotora na célula tumoral



Fonte: Adaptado de Esteller, 2000.

Esteller, em seu trabalho publicado em 2005, propõe que um determinado gene é preferencialmente metilado em um tipo tumoral, em detrimento a outros genes, porque sua inativação pode conferir ao tumor uma vantagem seletiva. Outra opinião é vista no trabalho de Di Croce e colaboradores, em 2002. Neste trabalho os autores propuseram que o que realmente ocorre é uma hipermetilação aberrante do genoma. Este fenômeno ocorreria pelo fusionamento das proteínas PML-RAR, que recrutariam as DNMTs para os sítios de metilação.

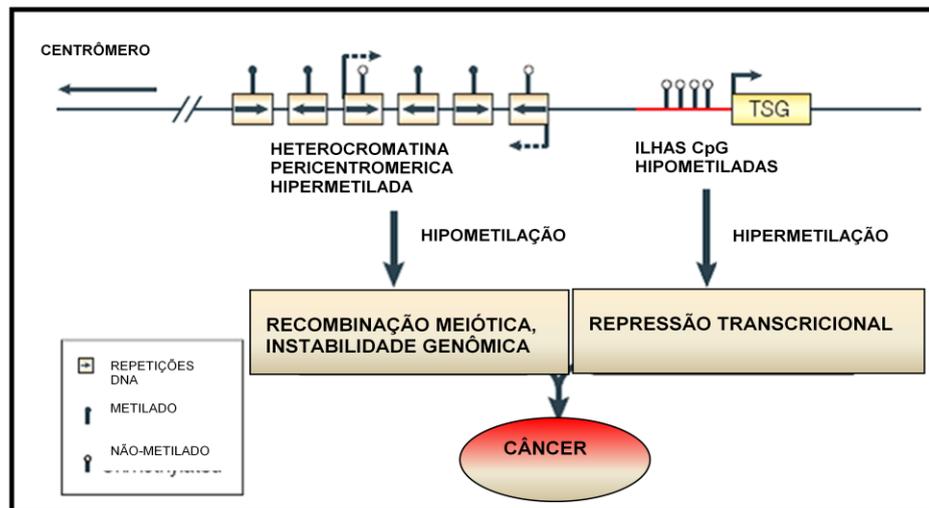
Como a metilação do DNA é um fenômeno reversível, a utilização de agentes capazes de impedir a ação das DNMTs tem sido objeto de muitos estudos, para novas terapias no tratamento do câncer. Um dos objetivos da terapia epigenética contra o câncer é restaurar o padrão de metilação do DNA e prevenir que novas células adquiram metilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes chave (Widschwendter *et al*, 2004).

Tratamento com agentes demetilantes podem reativar genes que apresentam regiões promotoras metiladas em tumores específicos, como já visto em experimentos *in vivo* para os genes *p16*, *hMLH1* e *Rb*, os quais estão extremamente relacionados ao controle da proliferação celular, diferenciação, reparo do DNA e apoptose. Estes agentes inibidores de DNMTs tem se mostrando bem efetivos no combate a hipermetilação de promotores de genes importantes, mas acabam causando hipometilação inespecífica do genoma. Esta hipometilação pode acarretar a expressão de proteínas inespecíficas e promover a

instabilidade do genoma pelo fato de se tornar propícias a expressão de regiões satélites do genoma que comumente se mantém metiladas (Yoo e Jones, 2006).

Na figura 12 temos um esquema simplificado de como as alterações do padrão normal de metilação do genoma podem desencadear a carcinogênese.

Figura 12: Vias de desenvolvimento tumoral a partir de alterações no padrão de metilação do genoma.



TSG: transcrição da sequenciagênica. Adaptado de Robertson, 2005.

### Metilação do DNA e câncer de mama

A metilação do DNA aparece nos eventos iniciais da carcinogênese na mama, resultando em alterações na expressão de diversos oncogenes e genes supressores de tumor, desencadeando a proliferação de células anormais (Chekhun et al, 2006). Tanto a hipometilação global do DNA, como a hipermetilação regional podem ocorrer primeiro. A hipermetilação regional de ilhas CpG presentes em regiões promotoras e a hipometilação global do DNA estão envolvidas em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer de mama (Van Zhee et al, 1998). A hipometilação pode atuar como um mecanismo tardio, em estágios mais avançados da doença, enquanto a hipermetilação de regiões promotoras ocorre principalmente em estágios iniciais da carcinogênese mamária (Szyf, 2000).

Numerosos estudos tem revelado uma gama de genes que apresentam o nível de sua expressão em células tumorais de mama relacionados a alterações no padrão de metilação do DNA (Agrawal et al, 2007). Segundo Lo e colaboradores, em 2008, dentre estes genes, podemos destacar alguns exemplos que apresentam função na regulação do ciclo celular (*p16* e *p14ARF*), apoptose (*APC* e *DAPK1*), reparo do DNA (*MGMT* e *BRCA1*), regulação

hormonal (*ERα* e *PR*), adesão e invasão celular (*CDHI* e *APC*), angiogênese (*maspin* e *THBS1*) e crescimento celular (*RASSF1A*, *NES1* e *WIFI*).

Alterações no gene *BRCA* aparecem em aproximadamente 50% dos casos de tumores de mama hereditários (Elstrodt et al, 2006). Foi observado que o gene *BRCA1* pode apresentar hipermetilação em seu promotor em tumores de mama e de ovário, mas não em casos de câncer no intestino, fígado e leucemia, indicando que a metilação no promotor deste gene é tumor específica (Yang et al, 2006). A frequência de hipermetilação do promotor deste gene em tumores de mama esporádicos é de 38,5% (Birgisdottir et al, 2006).

O aumento nos níveis de metilação da região promotora dos genes de receptores de esteróides e de glicoproteínas, como por exemplo os receptores de progesterona e E-caderina, estão associados a formas tumorais mais agressivas (Ross et al, 1996). A hipermetilação de ilhas CpG presentes na região promotora do gene *e-caderina* está presente em 80% dos casos de carcinoma lobular invasivo e lobular *in situ*, indicando a importância do padrão de metilação da região promotora deste gene no desenvolvimento do câncer de mama (Droufakou et al, 2001). Hoque e colaboradores observaram, em trabalho publicado em 2008, que a hipermetilação do gene *e-caderina* é um evento importante nos estágios iniciais de progressão do câncer de mama, propondo a análise do perfil de metilação deste gene como ferramenta de prognóstico.

Além dos critérios adotados normalmente no diagnóstico do câncer de mama, novas técnicas como a análise de padrões aberrantes de metilação também podem auxiliar o diagnóstico da doença. A análise da presença de DNA hipermetilado em secreções mamárias, juntamente com outras análises moleculares e a determinação da presença de metástase em linfonodos, pode ser utilizada como indicativo de desenvolvimento do câncer de mama (Yang et al, 2001). Carcinomas ductais *in situ* podem ser detectados em estágios iniciais pela análise de metilação em genes supressores de tumor e outros genes em amostras de secreção mamária (Dua et al, 2006). Assim, estudos que procuram identificar o padrão de metilação em genes específicos podem aprimorar o diagnóstico em pacientes com processos tumorais em estágios iniciais (Agrawal et al, 2007).

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo Geral

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 de metilação da região promotora de genes supressores de tumor e de reparo do DNA em câncer de mama esporádico.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar e correlacionar o perfil de metilação da região promotora do gene de reparo *hMLH1* e a frequência de instabilidade do microsatélite D3S1611, localizado neste mesmo gene.
- b) Analisar o perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *TP53*.
- c) Analisar o perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *CHD5*.
- d) Associar os resultados obtidos com as características clínico histopatológicas das amostras

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras biológicas de pacientes com câncer de mama

Para este trabalho, foram analisados 60 pares de amostras de tecido mamário (normal e tumoral da mesma paciente) provenientes de biópsia de mulheres apresentando câncer de mama, sem histórico familiar. As biópsias foram obtidas, entre os anos de 2006 e 2009, no setor de Patologia do Instituto Fernandes Figueira (IFF) FIOCRUZ- Rio de Janeiro. Os tecidos coletados nas biópsias eram armazenados em nitrogênio líquido até o momento da extração de DNA genômico. A obtenção das amostras biológicas obedeceu a todos os requisitos estipulados pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP).

Para o diagnóstico clínico-histopatológico e testes de imunohistoquímica para receptores de estrogênio, progesterona e para proteína p53 das amostras, foram analisadas lâminas contendo os cortes histológicos provenientes dos blocos de tecido congelado com a biópsia de tecido tumoral fixada. As lâminas, em geral, são coradas com hematoxilina e eosina para o diagnóstico de rotina. Identificadas as lâminas, a médica patologista Dra. Elizabeth Avvad (IFF) fez uma análise criteriosa para confirmar o diagnóstico e emitir o laudo histopatológico completo, incluindo a graduação de Elston (Elston e Ellis, 2002) e estadiamento TNM. Os demais dados das pacientes foram obtidos de formulários médicos

### 2.2 Extração de DNA genômico

Os DNAs provenientes de biópsia foram extraídos a partir de 0,1 g de tecido fresco congelado seguindo o método “salting-out” (Miller et al, 1988). As amostras teciduais congeladas foram colocadas em microtubos e foram adicionados 1,2 mL da solução de digestão (100 mM de NaCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0 e 0,5% de SDS). Após a adição da solução de digestão, as amostras teciduais foram maceradas, com posterior adição de 20 µL de proteinase K (20 mg / mL). Os tubos foram incubados durante 12 horas a 57°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Eppendorf) a 16.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e adicionou-se 300 µL de solução saturada de NaCl (aproximadamente 5 M). Os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Eppendorf) a 16.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio, os quais continham 3 volumes de

etanol absoluto. Com o auxílio de bastonetes de vidro estéreis, o DNA foi retirado e rapidamente imerso em solução de etanol 70%. As amostras de DNA, aderidas aos bastonetes, permaneceram à temperatura ambiente por 2 horas e foram solubilizadas através de incubação em 500  $\mu$ L de TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0) por duas horas a 37°C.

### 2.3 Eletroforese do 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 0,5  $\mu$ g /  $\mu$ L de solução de agarose. A corrida eletroforética foi realizada com o tampão TAE 1X (0,04 M de Tris-base; 1 M de ácido acético glacial; 50 mM de EDTA pH 8,0) a 80 V durante 30 minutos. Foi aplicada no gel uma mistura de 1  $\mu$ L de DNA e 5  $\mu$ L de tampão de carregamento 6X (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1% de azul de bromofenol; 0,1% de azul de cianol; 5% de ficoll 400). Após a corrida, o gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação (Software UVP DOC-ItLS da Life Science), utilizando luz ultravioleta, e a concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro.

### 2.4 Modificação do DNA com bissulfito de sódio

A análise do estado de metilação de sequências nas regiões promotoras dos genes em estudo foi realizada com utilização do método de modificação do DNA através da reação com bissulfito de sódio. O método consiste basicamente em desaminar o DNA genômico em condições nas quais as citosinas são convertidas em uracilas e as 5-metilcitosinas permanecem inalteradas.

Em nosso estudo, utilizamos o kit EPITECT (Quiagen) para modificação do DNA com bissulfito de sódio. Em cada reação, 1000 ng de DNA genômico foram colocados em microtubos de 200  $\mu$ L. Todas as soluções utilizadas são provenientes do kit EPITECT. O volume foi ajustado em 20  $\mu$ L com adição de água livre de RNase. Feito o ajuste do volume, 85  $\mu$ L do Mix Bissulfito dissolvido e 35  $\mu$ L de tampão de proteção ao DNA foram adicionados ao tubo, formando um volume final de 140  $\mu$ L. Após uma breve mistura das soluções, os tubos foram colocados em termociclador (Veriti – Applied Biosystems) e o seguinte programa foi realizado:

- 1ª etapa: desnaturação a 99°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 25 minutos;
- 2ª etapa: desnaturação a 99°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 85 minutos;
- 3ª etapa: desnaturação a 99°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 175 minutos.

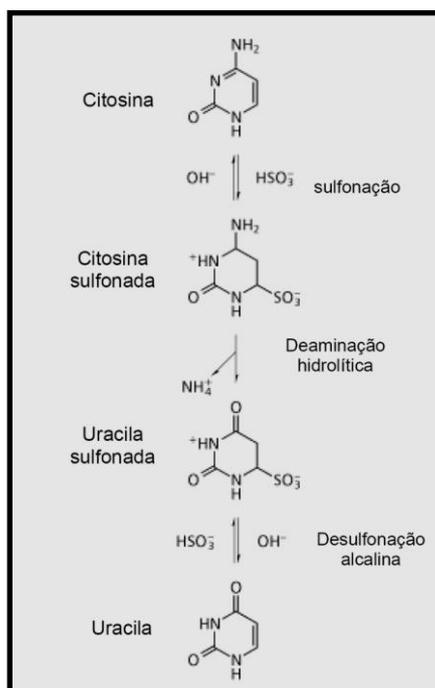
Terminada a incubação do DNA com a solução de bissulfito no termociclador, todo o conteúdo da reação foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 560 µL de tampão BL. A mistura foi transferida para a coluna de purificação do kit posicionada sobre um tubo coletor, com posterior centrifugação 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. Nova centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm foi realizada e o material depositado no tubo coletor foi descartado. Para dar continuidade ao processo de modificação, há a necessidade da realização da dessulfonação alcaliana, que é realizada pelo tampão BD. Assim, adicionou-se à coluna 500 µL do tampão BD e desenvolveu-se uma incubação do DNA com este tampão por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação nova centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm foi realizada e o material depositado no tubo coletor foi descartado.

Com o término da dessulfonação, o DNA se encontra modificado com bissulfito de sódio, mas há a necessidade de se retirar o excesso de sal depositado nele. Para isto, adicionou-se, à coluna, 500 µL de tampão BW e nova centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm foi realizada 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 no centro da membrana e nova centrifugação foi realizada, a 12.000 rpm, por 1 minuto. O DNA modificado permaneceu armazenado a -20°C.

A figura 13 está apresentando um esquema da reação de modificação do DNA com bissulfito de sódio.

Figura 13: Etapas da reação de modificação do DNA com bissulfito de sódio

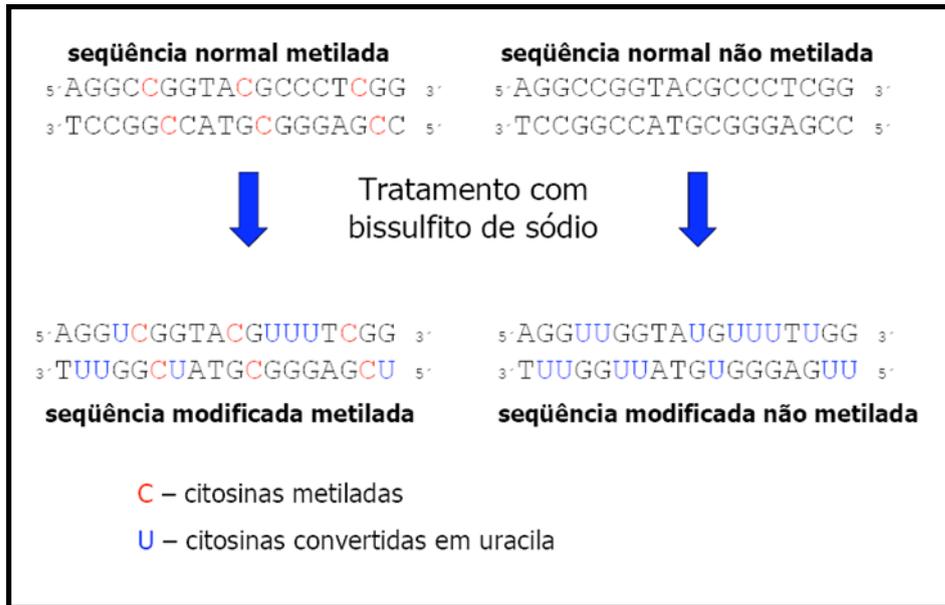


As citosinas não metiladas são convertidas em uracila por três etapas principais, que consistem em uma sulfonação seguida de um processo de desaminação e posterior dessulfonação alcalina. As citosinas metiladas não são capazes de sofrer o processo inicial de sulfonação. Portanto, não estão sujeitas ao posterior processo de desaminação, não sendo convertidas em uracila.

## 2.5 PCR para análise do estado de metilação do DNA

Após a reação de modificação com bissulfito de sódio, as sequências de DNA metilado e não metilado se tornam distintas (figura 14). A técnica do MSP baseia-se nas diferenças entre as sequências após este tratamento, pois as citosinas não metiladas transformam-se em uracila e as citosinas metiladas não sofrem alteração. Duas reações de PCR são realizadas para cada amostra de DNA: em uma reação são utilizados iniciadores específicos para ligação ao DNA metilado (contendo citosinas) e na outra reação utilizam-se iniciadores específicos para se ligar ao DNA não metilado (contendo uracilas / timinas). O quadro 4 apresenta a sequenciados iniciadores das reações de PCR-MSP (“methylation specific PCR”).

Figura 14: Diferença na sequênciado DNA após tratamento com bissulfito de sódio



Observar que as citosinas localizadas fora dos dinucleotídeos CG são transformadas em uracilas, independente do estado do DNA (não metilado ou metilado). Por outro lado, as citosinas localizadas nos dinucleotídeos CG são transformadas em uracilas se elas não se encontram na forma metilada, mas permanecem inalteradas quando metiladas.

Quadro 4: Sequências dos indicadores da reação de MSP, tamanho dos produtos (amplicon) e temperaturas de pareamento

Iniciador	Sequenciado iniciador (5'-3')	Amplicon	Temperatura de anelamento (°C)
<i>TP53 – metilado</i>	TTCGGTAGGCGGATTATTTG F AAATATCCCCGAAACCCAAC R	193 pb	60
<i>TP53 – não-metilado</i>	TTGGTAGGTGGATTATTTGTTTF CCAATCCAAAAAACATATCAC R	247 pb	59
<i>hMLH1 – metilado</i>	GCGCGTTCGTCGTTTCGTTAT F ATCTATCGCCGCTCATCGT R	113 pb	60
<i>hMLH1 – não metilado</i>	GGTTAAGAGGTGGTAGTGTT F ATCTATCACCACCTCATCAT R	206 pb	59
<i>CHD5 – metilado</i>	GTAGGTTAAGGCGGTTCGAGA F GCAACAACCTCCTCGATA R	180 pb	62
<i>CHD5 – não metilado</i>	GTAGGTTAAGGTGGTTGAGA F CAACAACCTCCTCAATAC R	235 pb	57

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 DNA polimeraseTaq

Platinum (Invitrogen), tampão da enzima 1X (Invitrogen) e 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) em volume final de 25 µL, sendo este volume completado com água deionizada. O programa da PCR consistiu em uma primeira desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 95°C por 40 segundos, a etapa de anelamento variando conforme o iniciador por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Em seguida, foi realizada a extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações da PCR foram realizadas em termocicladores Veriti (Applied Biosystems).

O controle positivo para as reações com os oligonucleotídeos desenhados para a fita de DNA metilada foi obtido através da reação de metilação do DNA *in vitro* com a enzima metiltransferase *SssI* (New England Biolabs®). Para esta reação, foi utilizado DNA extraído de sangue periférico de indivíduo saudável. A reação foi executada com volume final de 20 µL, contendo 4 µg de DNA genômico, 1X do tampão NE-II (New England Biolabs®), 320 µM de S-adenosil metionina (New England Biolabs®) e 8 U da enzima metiltransferase *SssI*. Após o preparo da reação, a solução foi incubada a 37°C por 60 minutos e inativada a 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 e 20 U da enzima *BstUI*. A reação foi incubada a 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.

## 2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%

Os produtos da PCR-MSP foram analisados por meio de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8% não-desnaturante. O gel foi vertido entre duas placas, uma de 12 mm e outra de 14 mm, com espaçamento de 1,5 mm. O gel foi mantido a temperatura ambiente, para polimerização, por no mínimo 15 minutos. Para a eletroforese, 8 µL das amostras provenientes da PCR foi misturado a 2 µL do tampão de carregamento 6X e aplicado nos poços formados pelo pente. A eletroforese foi realizada por 60 minutos a 120 V, 100 mA e 50 W com tampão TBE 1X (0,9 M de Tris-base; 0,9 M de ácido bórico; 20 mM de EDTA pH 8,0).

O par de placas contendo o gel de poliacrilamida 8% (2 mL de bis-acrilamida 40%; 1 mL de TBE 10; 100 µL de persulfato de amônio 10%; 10 µL de TEMED) foi aberto com a ajuda de uma espátula.

Utilizou-se, como referência de tamanho dos produtos da PCR, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 100 pares de base (Gene Ruler<sup>TM</sup> – Fermentas).

## 2.7 Detecção do material amplificado por coloração com nitrato de prata

O gel após a eletroforese foi colocado em uma bandeja contendo solução fixadora (solução de ácido acético 10%). Segundo protocolo publicado por Bassam e colaboradores em 1991, o gel foi mantido nesta solução, com agitação, por 20 minutos. Em seguida, houve duas lavagens por dois minutos do gel com água destilada. Após a retirada total da solução de fixação, o gel foi incubado em solução de coloração (0,1 g de nitrato de prata; 150 µL de formaldeído 37% em volume final de 100 mL de água) por 30 minutos. Subseqüentemente, o gel foi lavado em água destilada, por 10 segundos, e os produtos de amplificação revelados pela adição de solução de revelação (3 g de carbonato de sódio; 150 µL de formaldeído 37%; 100 µL de tiosulfato de sódio a 10 mg / mL; em volume final de 100 mL). O gel permaneceu nesta solução até que os produtos de amplificação estivessem definidos (aproximadamente 3 minutos). Para interromper a reação, adicionou-se a solução fixadora.

Todas as amostras que apresentaram perfil de hipermetilação nas regiões promotoras estudadas passaram por nova modificação de DNA com bissulfito e sódio, seguido de MSP para a região promotora com hipermetilação, afim de confirmar o resultado.

## 2.8 PCR para amplificação do *locus* STR

Para a análise da frequência de instabilidades em microsatélite no *locus* STR D3S1611 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Özer, 2002):

Iniciador F: 5' - CCCCAAGGTGCACTT - 3'

Iniciador R: 5' - AGCTGAGACTACAGGCATTTG - 3'

As reações da PCR foram realizadas com 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 µL do tampão STR 10x (Biotools), 0,2 µM de cada dNTP, 2,0 µM de Mg e 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Biotools, 5 U / µL), aproximadamente 100 ng de DNA e água destilada deionizada, para o volume final de 25 µL. A reação da PCR foi realizada seguindo os

seguintes ciclos: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C, 10 ciclos compostos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1,5 minuto a 70°C e 20 ciclos compostos por 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 60°C e 1,5 minuto a 70°C, seguidos de uma extensão final a 60°C por 15 minutos.

## 2.9 Eletroforese em gel de agarose 2,0%

Para a verificação da eficiência da reação da PCR, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo ( 0,5 µg / µL) . A corrida eletroforética foi realizada a 110 V por 20 minutos. Foram aplicados no gel 4,0 µL do material amplificado juntamente com 2 µL de tampão de carregamento 6x. O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação (Software UVP DOC-ItLS da Life Science), utilizando luz ultravioleta.

## 2.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante

Foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida 6% montado entre placas de vidro, de tamanho 36 x 19 mm. As placas foram previamente incubadas em solução de NaOH 10% por 2 horas e lavadas com detergente. Em seguida, as placas foram lavadas, duas vezes, com água destilada e solução de etanol 70%. O gel se fixa em uma das placas, a qual foi tratada com 50 mL de solução aderente (50 mL de etanol absoluto, 30 µL de metacriloxi-propil-trimetoxi-silano e 150 µL de ácido acético glacial). Após 5 minutos, o excesso de solução foi removido com papel toalha saturado em etanol 70%. Para que o gel não se fixe na outra placa, foi adicionada à ela uma película de óleo de soja, que permaneceu sobre ela por 15 minutos. Após os tratamentos, as placas foram sobrepostas com espaçadores de 0,2 mm em suas extremidades e vedadas com auxílio de grampos. Foi adicionado a 40 mL de solução de poli-ureia 6% (210,1 g de uréia (7M); 25 mL de TBE 10X; 75 mL de bis-acrilamida 40%; em volume final de 500 mL de água) 30 µL de TEMED e 300 µL de persulfato de amônio 10%. A solução foi, então, vertida entre as placas com o auxílio de uma seringa de 50 mL. O gel foi mantido a temperatura ambiente por 45 minutos para a sua polimerização.

Anteriormente à eletroforese, ocorreu uma pré-corrida de aproximadamente 30 minutos para aquecimento do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão de corrida TBE 0,5X a 2200 V, 50 mA e 60 W, por 1 hora e 30 minutos. Para a preparação das amostras, foram misturados 1 µL dos produtos da PCR e 10 µL de tampão de carregamento

de acrilamida 2X desnaturante (10 mM de NaOH; 95% de formamida; 0,05% de azul de bromofenol; 0,05% de xileno cianol). A mistura foi desnaturada a 94°C por 3 minutos e mantida em gelo até o momento da aplicação.

#### 2.10.1 Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata

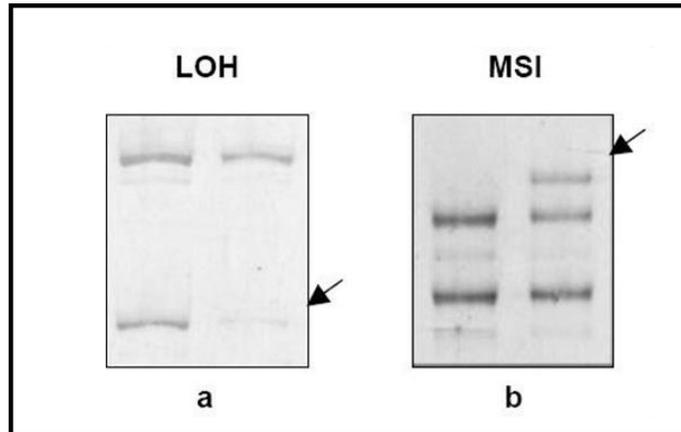
Após a corrida eletroforética, as placas foram separadas e o gel, fixado em uma delas, foi incubado em solução de fixação (ácido acético 10%, em volume de 500 mL) por 20 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada por 2 minutos. Após a lavagem, o gel foi incubado em solução de coloração (0,5 g de nitrato de prata; 750 µL de formaldeído (37%) em volume final de 500 mL de água) por 30 minutos, com posterior lavagem com água destilada por 10 segundos (Bassam et al, 2007).

Para a revelação do gel, este foi mantido em solução de revelação (15 g de carbonato de sódio; 750 µL de formaldeído (37%); 100 µL de tiosulfato de sódio (10 mg / mL) em volume final de 500 mL) pelo tempo necessário para o aparecimento das bandas de DNA. Para interromper a reação de coloração do gel, adicionou-se solução de ácido acético 10%.

#### 2.11 **Determinação de instabilidade genômica**

Foi considerada instabilidade em microsatélite (MSI) a alteração no número de alelos na amostra tumoral em relação à amostra normal (figura 15 b). Para determinar a frequência de MSI dividiu-se o número de amostras apresentando MSI pelo total de amostras. A perda de heterozigose (LOH) em microsatélites foi caracterizada pela perda total ou parcial de um dos dois alelos na amostra tumoral em relação à amostra normal e a determinação da frequência de LOH foi estabelecida pela divisão do número de amostras apresentando LOH pelo número de amostras informativas, isto é, heterozigotas (Figura 15 a).

Figura 15: Exemplos de instabilidades genômicas em microsatélite verificadas em nosso trabalho



Fotos de géis de poliacrilamida 6% corados por nitrato de prata. A seta indica o alelo instável. a- LOH; b- MSI.

### 2.12 Análise estatística

O teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher, com uso do software GraphPad Prism 5, foram realizados para verificar a existência de associação entre os resultados obtidos na análise do perfil de metilação na região promotora dos genes estudados e as características clinico-histopatológicas das amostras de carcinoma mamário. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Características clínico-histopatológicas das amostras de câncer de mama esporádicos

As características clínico-histopatológicas das amostras utilizadas neste trabalho estão listadas no quadro 5.

Quadro 5: Características clínico-histopatológicas dos 60 pacientes estudados determinadas pela Dra. Elizabeth Avvad.

Paciente	Idade (anos)	Diagnóstico Histopatológico	TNM	GE	RP	RE	P53
2	54	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMx	I	+	+	-
4	51	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMx	II	+	+	-
5	56	Intraductal tipo sólido	pTis pN0 (sn) pMx	*	X	X	X
6	58	Ductal Infiltrante	pT2c pN2a pMx	III	-	-	+
8	51	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMx	I	+	+	-
9	63	Lobular Infiltrante	pT2c pN0 (sn) pMx	*	-	+	-
10	46	Ductal Infiltrante	pT2 pN0 pMx	III	-	-	+
11	29	Intraductal	pTis pN0 pMx	*	+	+	-
14	56	Ductal Infiltrante	pT2 pN2a pMX	II	+	+	-
15	44	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMx	I	-	+	+
16	50	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMX	I	-	+	-
17	48	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	-	-	-
18	57	Medular	pT1c pN2a pMX	*	+	+	-
19	52	Mucinoso	pT1c pN0 (sn) pMX	I	-	+	-
21	41	Ductal Infiltrante	pT1b pN0 pMX	III	-	-	+
23	57	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	I	+	+	-
25	48	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 pMX	II	-	+	-
26	61	Ductal Infiltrante	pT3 pN0 pMx	III	-	-	-
27	74	Papilífero Infiltrante	pT1c pNx pMx	II	-	+	-
28	47	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 (sn) pMx	III	-	+	-
29	70	Papilífero Infiltrante	pT2 pN0(sn) pMX	I	+	+	-
31	38	Micropapilífero Infiltrante	pT2 pN1a pMx	III	-	-	-
32	50	Ductal Infiltrante	pT1c pN0 pMx	I	-	+	-
33	57	Ductal Infiltrante	pT1c pN2a pMx	III	-	+	-
34	46	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	III	X	X	X
35	49	Ductal Infiltrante	pT1c pN0(sn) pMx	II	+	-	-
36	54	Ductal Infiltrante	pT2 pN0(sn) pMx	II	-	-	+
37	48	Mucinoso	pT1c pN0(sn) pMx	I	-	+	-
38	61	Ductal Infiltrante	pT1b pN0(sn) pMx	I	+	+	-
40	67	Ductal Infiltrante	pT1c pN2 pMx	III	-	+	+

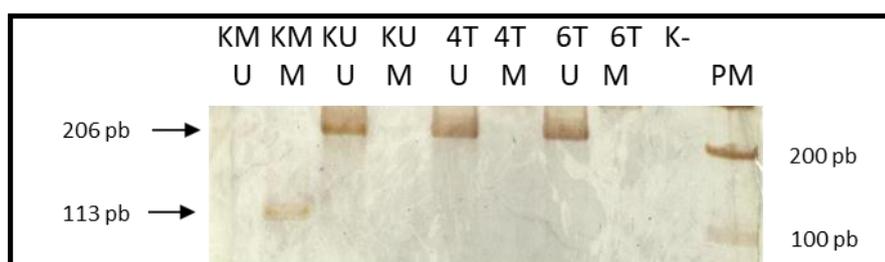
41	28	Ductal Infiltrante	pT3 pN1a pMx	II	+	+	-
42	42	Ductal Infiltrante	pT2 pN0(sn) pMx	I	+	+	-
43	53	Intraductal tipo comedocarcinoma	pTis pN0(sn) pMx	*	-	-	-
44	59	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	+	+	-
45	45	Lobular Infiltrante	pT2 pN2a pMx	*	+	+	-
46	72	Ductal Infiltrante	pT2 pN3a pMx	II	-	+	-
47	72	Ductal Infiltrante	pT2 pN0 pMx	II	+	+	+
48	40	Ductal Infiltrante	pT1c pN0pMx	II	-	-	+
50	42	Lobular Infiltrante	pT1a pN1a pMx	*	+	+	+
52	40	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	+	+	-
53	60	Ductal Infiltrante	pT1c pN1a pMx	I	-	+	-
54	41	Apócrino Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	-	+	-
56	74	Ductal Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	-	+	-
58	71	Lobular Infiltrante	pT2 pN1a pMx	*	+	+	-
59	46	Apócrino Infiltrante	pT2 pN1a pMx	II	-	-	+
60	58	Ductal Infiltrante	pT2 pN1 pMx	I	+	+	-
61	44	Ductal Infiltrante	pT2 pN1b1 pMx	II	+	+	+
62	76	Ductal Infiltrante	pT1 pN0 pMx	II	+	+	-
63	71	Ductal Infiltrante	pT1pN1pMx	I	+	+	-
65	53	Papilífero infiltrante	X	II	+	-	-
67	70	Ductal Infiltrante	pT2pN0pMx	II	X	X	X
68	59	Micropapilífero Infiltrante	pT2 pN3 pMx	III	-	-	+
69	72	Lobular Infiltrante	pT1 pN0 pMx	*	+	+	+
70	50	Ductal Infiltrante	pT2 pNo	II	+	+	-
71	63	Lobular Infiltrante	pT1pN1pMx	*	+	+	+
72	68	Ductal Infiltrante	pT2 pN0 pMx	III	-	-	+
73	63	Papilífero Infiltrante	pT1 pN2 pMx	III	-	-	-
74	75	Ductal Infiltrante	pT1 pN0 pMx	III	-	-	+
75	41	Ductal Infiltrante	pT2pN1pMx	II	+	+	-
76	60	Micropapilífero Infiltrante	pT2 pN2 pMx	II	+	+	-

P: número do paciente; Idade: idade do paciente no momento da coleta; TNM: Tumor-nódulo-metástase; GE: Graduação histológica de Elston; \*: Tumores onde normalmente não se aplica a graduação histológica de Elston; RP: Receptor de progesterona, RE: Receptor de estrogênio, P53: Proteína P53; +: proteína expressa em altos níveis; -: proteína expressa em baixos níveis. X: Não foi possível realizar a imunohistoquímica nas amostras 5 e 67.

### 3.2 Análise do perfil de metilação da região promotora do gene de reparo *hMLH1*

A fim de determinarmos o perfil de metilação na região promotora do gene de reparo *hMLH1*, foram analisadas 60 pares amostras de tecido normal e tumoral provenientes de biopsia de pacientes de carcinoma mamário esporádico. A figura 16 mostra um exemplo de análise do perfil de metilação da região promotora do gene *hMLH1*. Neste exemplo, não há a presença de hipermetilação nas amostras analisadas.

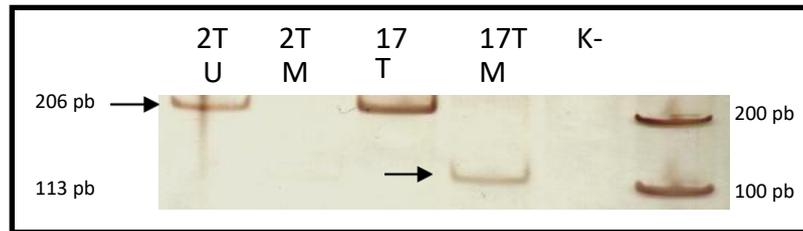
Figura 16: Análise do perfil de metilação na região promotora do gene *hMLH1*.



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; 4T: amostra tumoral 4 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *hMLH1*; 6T: amostra tumoral 6 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *hMLH1*. As setas indicam os produtos de PCR para as reações contendo DNA hipermetilado (113 pb) e hipometilado (206 pb)

Na análise do perfil de metilação da região promotora do gene *hMLH1*, observamos que 13 das 60 amostras, isto é, 21,6% das amostras, apresentaram perfil de hipermetilação na região promotora do gene *hMLH1* (17T, 26T, 27T, 31T, 33T, 34T, 43T, 47T, 60T, 62T, 67T, 70T e 71T). A figura 17 apresenta um exemplo de hipermetilação encontrado nas amostras analisadas. Podemos observar que a amostra 17T apresentou perfil de hipermetilação e também apresentou amplificação na reação com primers para fita não-metilada. Este fato se deve a provável contaminação de células normais na amostra de tecido tumoral e / ou a presença de sequencias de DNA não metiladas nas células tumorais.

Figura 17: Perfil de hipermetilação na região promotora do gene *hMLH1*

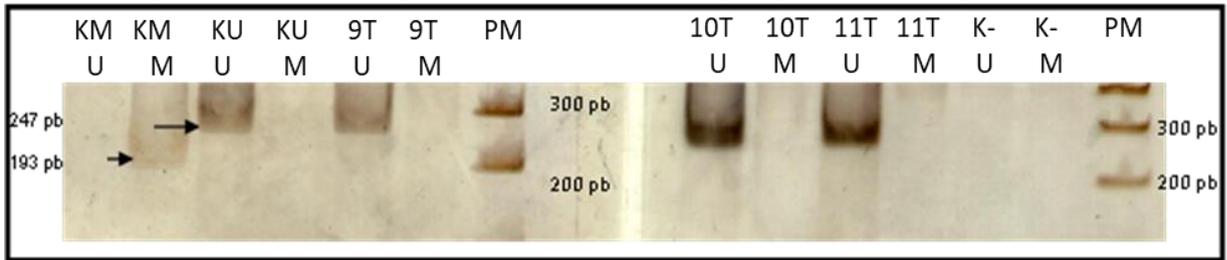


Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. U: reação com primers desenhados para fita de DNA não-metilada; M: reação com primers desenhados para fita de DNA hipermetilada K-: controle negativo das reações; PM: padrão de peso molecular; 2T: amostra tumoral 2 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *hMLH1*; 17T: amostra tumoral 17 apresentando perfil de hipermetilação na região promotora do gene *hMLH1*. As setas indicam os produtos de PCR para as reações contendo DNA hipermetilado (113 pb) e hipometilado (206 pb).

### 3.3 Análise do perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *TP53* em amostras de carcinoma mamário

Na análise do perfil de metilação da região promotora do gene *TP53*, também foram analisadas 60 pares de amostras, normais e tumorais tumorais, provenientes de biopsia de pacientes de carcinoma mamário esporádico. Todas as amostras apresentaram perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*. A figura 18 apresenta, como exemplo, os perfis obtidos para as amostras 9, 10 e 11, todos iguais ao do controle da reação para a fita não metilada (KU).

Figura 18: Análise do perfil de metilação da região promotora do gene *TP53*

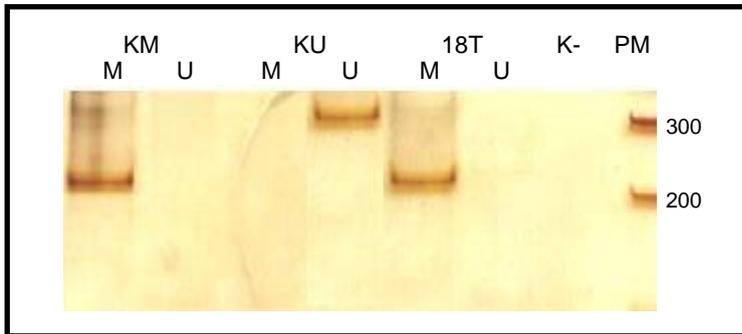


Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. U: reação com primers desenhados para fita de DNA não-metilada; M: reação com primers desenhados para fita de DNA hipermetilada; KM: controle da reação com primers desenhados para fita de DNA metilada; KU: controle reação com primers desenhados para fita de DNA não-metilada; K-: controle negativo das reação; PM: padrão de peso molecular; 9T: amostra tumoral 9 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*; 10T: amostra tumoral 10 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *TP53*. 11T: amostra tumoral 11 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)

#### 3.4 Análise do perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *CHD5*

Na análise do perfil de metilação da região promotora do gene *CHD5*, dentre as 60 amostras de carcinoma mamário analisadas, 9 apresentaram perfil de hipermetilação (5T, 6T, 14T, 18T, 37T, 38T, 47T, 54T e 71T), o que corresponde a 15% das amostras analisadas. A figura 19 apresenta um exemplo de análise realizada, evidenciando os controles da reação e a presença de hipermetilação na amostra

Figura 19: Análise do perfil de metilação da região promotora do gene *CHD5*.

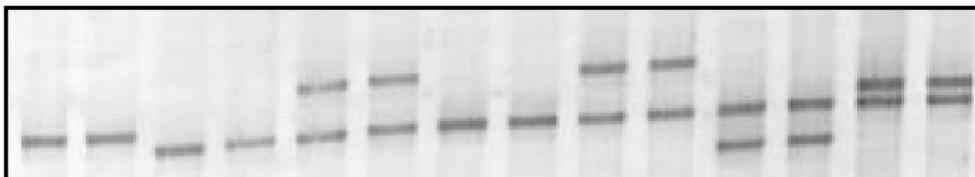


Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. M: reação com primers desenhados para fita de DNA hipermetilada; KM: controle da reação com primers desenhados para fita de DNA metilada; K-: controle negativo das reação; PM: padrão de peso molecular; 18T: amostra tumoral 18 apresentando perfil de hipermetilação na região promotora do gene *CHD5*; 21T: amostra tumoral 21 apresentando perfil de hipometilação na região promotora do gene *CHD5*.

### 3.5 Frequencia de instabilidade do STR D3S1611

Para determinar a frequência de instabilidade do *locus* STR D3S1611 em carcinomas mamários esporádicos, os mesmos 60 pares de amostras, normal e tumoral, foram analisados. O *locus* STR D3S1611 foi amplificado pela PCR e os produtos foram analisados em gel desnaturante corado por nitrato de prata. A figura 20 mostra um exemplo de corrida eletroforética dos produtos amplificados.

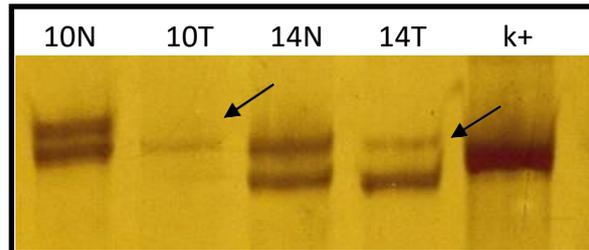
Figura 20: Eletroforese dos produtos amplificados no locus D3S1611.  
32N 32T 33N 33T 34N 34T 35N 35T 36N 36T 37N 37T 38N 38T



Exemplo de gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata. Produtos de amplificação para o locus STR D3S1611, tipado nos pares de amostras 32 a 38. Estas amostras não apresentaram instabilidade; N: Amostra normal e T: Amostra tumoral.

Dentre as 60 amostras, somente 38 são informativas, isto é, heterozigotas, e destas, 5 apresentaram LOH, representando 13,1% (10, 14, 21, 40 e 76). A figura 21 apresenta duas amostras que apresentaram LOH no STR D3S1611. Não foi observado nenhum caso de MSI neste *locus* STR dentre as amostras analisadas.

Figura 21: Eletroforese dos pares de amostras apresentando LOH



Exemplo de gel de poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata. Produtos de amplificação para o locus STR D3S1611, nos pares de amostras 10 e 14. N: Amostra normal, T: Amostra tumoral, K+: controle positivo da reação de PCR. A seta indica qual alelo foi perdido nas amostras tumorais, em relação a genotipagem na amostra normal.

O quadro 6 nos apresenta um panorama geral dos resultados obtidos na análise do perfil de metilação dos genes estudados e a frequência de instabilidades no STR D3S1611 nas amostras analisadas.

Quadro 6: Resultados obtidos na análise dos perfis de metilação e de instabilidade em microssatélite.

Amostra	Idade (anos)	Subtipo histológico	GE	CHD5	TP53	hMLH1	LOH
2	54	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
4	51	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
5	56	Intraductal tipo sólido	*	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
6	58	Ductal Infiltrante	III	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
8	51	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
9	63	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
10	46	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	SIM
11	29	Intraductal	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
14	56	Ductal Infiltrante	II	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	SIM
15	44	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
16	50	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
17	48	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
18	57	Medular	*	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
19	52	Mucinoso	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
21	41	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	SIM
23	57	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
25	48	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
26	61	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
27	74	Papilífero Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
28	47	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
29	70	Papilífero Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
31	38	Micropapilífero Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
32	50	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
33	57	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
34	46	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
35	49	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
36	54	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
37	48	Mucinoso	I	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
38	61	Ductal Infiltrante	I	Hipermetilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
40	67	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	SIM
41	28	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
42	42	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
43	53	Intraductal tipo comedocarcinoma	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
44	59	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
45	45	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
46	72	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
47	72	Ductal Infiltrante	II	Hipermetilado	Hipometilado	Hipermetilado	NÃO
48	40	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
50	42	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO

52	40	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
53	60	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
54	41	Apócrino Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
56	74	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
58	71	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
59	46	Apócrino Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
60	58	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
61	44	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
62	76	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
63	71	Ductal Infiltrante	I	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
65	53	Papilífero infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
67	70	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
68	59	Micropapilífero Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
69	72	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
70	50	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
71	63	Lobular Infiltrante	*	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
72	68	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
73	63	Papilífero Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
74	75	Ductal Infiltrante	III	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
75	41	Ductal Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	NÃO
76	60	Micropapilífero Infiltrante	II	Hipometilado	Hipometilado	Hipometilado	SIM

*hMLH1*: perfil de metilação na região promotora do gene de reparo *hMLH1*; *TP53*: perfil de metilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP53*; *CHD5*: perfil de metilação na região promotora do gene supressor de tumor *CHD5*; LOH: perda de heterozigose no STR D3S1611; GE: graduação histológica de Elston; Idade: idade do paciente quando do diagnóstico da doença.

O quadro 7 apresenta a correlação entre as características clínico-histopatológicas das amostras e os resultados obtidos na análise do perfil de metilação na região promotora dos genes *hMLH1* e *CHD5*.



N: número de amostras; f: frequência; Idade: idade do diagnóstico em anos; GE: graduação histológica de Elston; T: tamanho do tumor; N: presença de linfonodos; RE: imunohistoquímica para receptor de estrogênio; RP: imunohistoquímica para receptor de progesterona; p53: imunohistoquímica para proteína p53; LOH: perda de heterozigose no *locus* D3S1611; NI: número de amostras não informativas.

Dentre as análises realizadas, podemos destacar a correlação entre a perda de heterozigose e a graduação histológica de Elston, indicando que a LOH ocorre preferencialmente em tumores mais avançados ( $p = 0,04$ ). Na análise do perfil de metilação na região promotora do gene de reparo *hMLH1* observamos que 12 das 13 amostras que apresentaram perfil de hipermetilação apresentaram idade de diagnóstico igual ou superior a 45 anos, mas este fato não se mostrou estatisticamente significativo ( $p = 0,432$ ).

## 4 DISCUSSÃO

Tendo em vista que o câncer de mama é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, realizamos um estudo com a finalidade de ajudar a esclarecer um dos vários mecanismos moleculares que ainda permanecem obscuros no desenvolvimento da doença.

Segunda estimativas do INCA, o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 será de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Um dos fatores que aumentam a mortalidade desta doença no Brasil é o fato de seu diagnóstico ser tardio na maioria dos casos, devido a falta de informação do paciente acerca da doença e auto-exames ou por falta de acesso a redes de saúde com qualidade. A cada ano, estima-se que 22% das formações tumorais entre as mulheres no mundo seja de tumores mamários.

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, novas análises puderam ser desenvolvidas na tentativa de desvendar quais fatores estão impedindo a atuação correta dos genes supressores tumorais e de reparo do DNA. No passado, a idéia central era de que as mutações seriam os únicos responsáveis pela inativação destes genes de controle, mas com as análises epigenéticas essa idéia mudou.

As alterações epigenéticas mostraram-se extremamente importantes no controle da transcrição gênica, exercendo sua função sobre genes chaves nas vias de sinalização celular e transcrição gênica (Esteller, 2003). Dentre os mecanismos epigenéticos, podemos destacar a importância da metilação do DNA, que consiste da adição do radical metil à citosinas em regiões do genoma denominadas ilhas CpG. A perda global desta metilação do DNA pode desencadear o fenômeno denominado instabilidade genômica e a presença de hipermetilação na região promotora dos genes impede a transcrição do gene em questão. Assim, se ocorrer hipermetilação na região promotora de um gene supressor de tumor, este gene não será transcrito e a célula poderá se transformar em uma célula cancerosa (Esteller, 2000).

### **Perfil de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *TP53***

Por se tratar de um gene extremamente importante no controle celular e por apresentar mutação em aproximadamente 50% dos tumores, os estudos acerca da inibição da atividade correta da proteína p53 visam buscar outras alterações a nível molecular, como o perfil de metilação de sua região promotora para tentar descobrir a razão pela qual a proteína não está

exercendo sua atividade corretamente. A região promotora do gene *TP53* não apresenta um significativo conjunto de ilhas CpG, fato necessário para se correlacionar a hipermetilação do promotor com a inibição da transcrição do gene por metilação. Porém, Hurt e colaboradores (2006) apresentaram um trabalho mostrando que esta região pode estar hipermetilada em diversos tipos de câncer e classificando a hipermetilação do promotor do gene supressor de tumor *TP53* como importante inibidor da expressão do gene em algumas neoplasias, como leucemia linfoblástica (Agirre et al, 2003), glioma, metástases de tumores cerebrais e tumores sólidos (Amatya et al, 2005).

Nossos resultados mostram ausência de hipermetilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP53* em amostras de carcinoma mamário esporádicos de mulheres brasileiras. Radpour e colaboradores (2010) encontraram baixos níveis de metilação na região promotora do gene *TP53*. Mas, apesar desta baixa frequência, a presença de hipermetilação foi correlacionada 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 a perda ou a redução da expressão de p53. Diferentemente de Radpour (2010), que estudou mais detalhadamente a região com utilização de espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS e conseguiu analisar vários pequenos fragmentos de DNA, nós analisamos um fragmento único através da técnica MSP-PCR, sendo esta uma técnica menos informativa para o estudo desta região. Mas, apesar disto, nossos dados corroboram a maioria dos estudos sobre o perfil de metilação na região promotora do gene *TP53*, que utilizaram a mesma técnica, como o publicado por Almeida em 2009 e Nayak em 1999.

Almeida e colaboradores (2009) mostraram que dentre as 90 amostras estudadas de tumores cerebrais extra-axiais do Hospital de Câncer de Barretos, foi observada uma frequência de hipermetilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP53* em 37,5% de meningiomas, 30% de schwannomas e 52,6% de tumores metastáticos. Neste trabalho os autores sugerem que a hipermetilação desta região seja importante para a progressão tumoral e metástase de tumores cerebrais.

Nayak e colaboradores (1999) em um dos primeiros trabalhos correlacionando metilação do promotor do gene *TP53* e câncer de mama, identificaram o perfil de hipometilação. Entretanto, Kang e colaboradores (2001) realizaram um trabalho na tentativa de verificar a importância do perfil de metilação na região promotora do gene *TP53* na progressão de um carcinoma ductal *in situ* para a forma invasiva. Foram analisadas 26 amostras de carcinoma mamário e observou-se que 11,5% dos casos apresentavam

hipermetilação da região promotora. Além disso, todas as amostras que apresentavam hipermetilação não apresentaram mutações em sua sequência codificadora. Os autores concluíram que não foi possível correlacionar o perfil de metilação do promotor do gene *TP53* com a progressão tumoral, mas que a hipermetilação da região promotora do gene *TP53* é uma via alternativa para a carcinogênese quando não há presença de mutação no gene.

A análise de mutações no gene *TP53* nas amostras utilizadas neste trabalho está sendo realizada no LBMT / DGen / UERJ por Cláudia Levy. Em seu trabalho, Cláudia Levy tem observado a ocorrência de mutações em 20% das amostras analisadas. Este fato nos faz pensar nas prováveis vias de inativação gênica que estão impedindo a atuação correta da proteína p53. Uma vez que somente 20% das amostras apresentam mutação e nenhuma apresentou hipermetilação na região promotora, outras vias de regulação estão atuando, possivelmente, impedindo sua atividade, como por exemplo atuação de microRNAs (Takwi e Li, 2009), supressão de proteínas como p21 e p19 (Radpour et al, 2010) e superexpressão de MDM2 (Moll e Petrenko, 2003).

### **Perfil de metilação da região promotora do gene de reparo *hMLH1* e a frequência de instabilidade do microsatélite D3S1611**

Alterações no gene de reparo *hMLH1* tem sido estudadas desde o início da década de 1990, quando foi descoberto que este gene estaria mutado em linhagens celulares de câncer colo-retal (Branch et al, 1995). Em 1997, Kane e colaboradores mostraram que o gene *hMLH1* pode perder a atividade de transcrição quando sua região promotora estiver hipermetilada. No trabalho foram utilizadas 66 amostras de adenocarcinomas esporádicos de tumores colo-retais e foi observado que 3 das 66 amostras não expressavam *hMLH1*. As 3 amostras não apresentavam mutação na sequência gênica, porém, apresentavam hipermetilação na região promotora.

Nosso trabalho é o primeiro a ser realizado no Brasil correlacionando o perfil de metilação do gene de reparo *hMLH1* e carcinomas mamários. Existia uma lacuna entre o estudo desta alteração epigenética no gene *hMLH1* e o câncer de mama na população brasileira, uma vez que muitos trabalhos indicam que este gene é importante na supressão tumoral. A frequência de 21,6% de hipermetilação na região promotora do gene de reparo *hMLH1* em amostras de carcinoma mamário de mulheres brasileiras que encontramos está de acordo do que é observado na literatura. A frequência de hipermetilação desta região em amostras de câncer de mama pode variar de 8 a 43,5% segundo Naqvi (2008).

Um dado importante a ressaltar em nosso trabalho é que dentre as 13 amostras que apresentaram hipermetilação no promotor do *hMLH1*, somente 1 apresentou idade de diagnóstico inferior a 45 anos, mas o dado não foi estatisticamente significativo. Provavelmente isto se deve ao pequeno tamanho do conjunto de amostras e provavelmente alguma correlação significativa aconteceria se o número de amostras aumentasse.

Na análise de instabilidade do microssatélite no STR D3S1611, 5 amostras apresentaram LOH, representando uma frequência de 13,1%. Todas as amostras que apresentaram LOH também apresentaram graduação de Elston igual a II ou III, havendo correlação entre a presença de LOH e graduação histológica elevada ( $p = 0,04$ ). Nenhuma amostra que apresentou LOH no STR D3S1611 apresentou também perfil de hipermetilação no promotor do gene *hMLH1*. Estes dados sugerem que a hipermetilação no promotor do gene *hMLH1* não está influenciando a presença de instabilidade no microssatélite D3S1611 nas amostras de carcinoma mamário analisadas.

Geng e colaboradores (2009) observaram o perfil de metilação no gene *hMLH1* e de instabilidade em STR em amostras de câncer de pulmão de pequenas células na população chinesa. Em seu trabalho, Geng concluiu que a inativação do gene por hipermetilação da região promotora combinada com a presença de LOH no STR D3S1612 seriam as responsáveis pela inativação da proteína hMLH1 nas amostras estudadas, caracterizando este fato como uma etapa importante no desenvolvimento de câncer de pulmão de pequenas células na população chinesa. Uma característica do trabalho a ressaltar, é a utilização do STR D3S1612 que é bem próximo ao utilizado em nosso trabalho.

Em adição ao trabalho de Geng (2009), Leal Rojas e colaboradores (2009) desenvolveram um trabalho analisando o perfil de metilação em amostras de tumores ginecológicos. No trabalho, foram analisadas amostras de tumores de ovário, endométrio, cérvix uterino e de mama. Os resultados apresentados mostram que 79% das amostras apresentaram hipermetilação no promotor do gene *hMLH1* e de outros genes como *p16* e *CDHI*. Assim, Leal Rojas e colaboradores puderam concluir que a hipermetilação da região promotora dos genes estudados em seu trabalho são um importante evento na carcinogênese de tumores ginecológicos e que o padrão de metilação está associado a natureza do tumor. Em outro estudo, Roa e colaboradores (2004) analisaram o perfil de metilação da região promotora do gene *hMLH1* em amostras de carcinoma mamário de mulheres chilenas. Seus resultados mostraram que 11,4% das amostras apresentavam hipermetilação no promotor do gene *hMLH1* e que a hipermetilação desta região está associada a um grupo étnico, os não-mapuche. Na conclusão do trabalho, os autores afirmam que alterações no padrão de

metilação do gene *hMLH1* podem ser consideradas como fator prognóstico, sendo esta análise uma importante ferramenta na procura de critérios para executar decisões clínicas e terapêuticas.

Karray-Chouayekh e colaboradores (2009) realizaram a análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *hMLH1* e *BRCA1* em amostras de biópsia de mulheres tunisianas que apresentavam câncer de mama invasivo. Das 78 amostras analisadas, 44,8% apresentaram hipermetilação no promotor do gene *BRCA1* e 21,7% no promotor do gene *hMLH1*. A hipermetilação no promotor do gene *BRCA1* foi correlacionada com a idade do paciente e com sobrevivência maior do que 5 anos após o tratamento. Os autores sugerem que a análise do promotor do gene *hMLH1* possa ser utilizada como marcador de estágio do tumor.

Ozer e colaboradores (2002) investigaram a presença de instabilidade em microssatélite em 16 amostras de tumores de mama em mulheres com menos de 35 anos. No trabalho foram analisados 5 *loci* STRs, D2S123, D3S1611, D17S807, D17S796 e Wq11-12, por comparação de produtos de amplificação de PCR entre as amostras normais e tumorais. Nenhuma instabilidade foi encontrada. Os autores concluem o trabalho com a hipótese de que a presença de instabilidade em microssatélite é algo incomum em tumores em estágios iniciais. Em outro trabalho, Chagpar e colaboradores (2004) buscaram a correlação entre a presença de instabilidade em microssatélites com as características clínico-histopatológicas dos pacientes. No trabalho foram analisados 100 pares de amostras normal e tumoral de mulheres canadenses com carcinoma mamário com graduação de Elston I e II em sete loci STR, sendo eles *hMLH1* (3p22, D3S1611), *hMSH2* (2p16, D2S123), *NM23-H1* (17q21), *TP53-Dint* (17p13), *TP53-Penta* (17p13), *APC* (5q21, D5S346), and *HPC1* (1q24, D1S2883). Os resultados do trabalho mostraram a existência de correlação entre a presença de instabilidades em microssatélites e metástase. Com a análise destes dois trabalhos podemos considerar que a presença de instabilidade em microssatélites seja um fator importante para a transição de tumor de mama *in situ* para invasivo. Em 2008, Plisiecka-Hałasa e colaboradores observaram que 38,5% das amostras de câncer de ovário estudadas em seu trabalho apresentavam instabilidade no STR D3S1611, indicando que este microssatélite apresentava alguma relação com a formação de tumores de ovário. Por se tratarem de órgãos relacionado aos ciclos menstruais, a correlação entre a análise de instabilidades no STR D3S1611 em tumores de ovário e de mama é importante para analisar como este *locus* se comporta nos tumores ginecológicos. Tanto em nosso trabalho quanto no trabalho publicado por Plisiecka-Hałasa e colaboradores (2009) pode-se observar a presença de instabilidade neste STR,

indicando que a análise de instabilidades no *locus* D3S1611 pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico em tumores em órgãos reprodutores femininos.

### **Perfil de metilação na região promotora do gene supressor de tumor *CHD5***

O braço curto do cromossomo 1 se apresenta muito instável em diversas formações tumorais e, devido a isto, a análise de seus genes se mostraram importantes na busca de algum gene relacionado a supressão tumoral. Assim, muitos trabalhos foram realizados na região cromossômica 1p36, em diversos tipos de tumores humanos, incluindo tumores de origem epitelial, neural e hematopoiético (Bagchi et al, 2008).

Nossa análise é um dos primeiros trabalhos correlacionando o perfil de metilação na região promotora do gene *CHD5* com câncer de mama. Até o presente momento, não foram encontradas publicações correlacionando o perfil de metilação na região promotora do gene *CHD5* e tumores de mama esporádicos, sendo este trabalho um dos primeiros realizados nesta busca na América Latina. Nossos resultados mostram que das 60 amostras analisadas, 9 apresentaram hipermetilação, representando frequência igual a 15%. Não foi observada correlação entre a presença de hipermetilação no promotor do gene *CHD5* e as características clínico-histopatológicas das amostras.

Em trabalho publicado em 2008, Okawa e colaboradores descrevem o gene *CHD5* como o mais promissor gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 1. Para caracterizar este gene como verdadeiro supressor de tumor, Fujita e colaboradores (2008) analisaram o perfil de metilação na região promotora do gene *CHD5* assim como a expressão da proteína em linhagens celulares de neuroblastoma e em 99 amostras de biopsia tumorais do mesmo tipo tumoral. A expressão de *CHD5* foi reduzida nas linhagens celulares e a região promotora apresentou alto perfil de hipermetilação, indicando que a inativação deste gene talvez seja um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de neuroblastomas. Os autores, por fim, concluem que a expressão de *CHD5* foi altamente associada com a sobrevivência dos pacientes e que esta expressão pode ser inibida por hipermetilação em seu promotor.

Outros autores realizaram pesquisas visando verificar os níveis de expressão de *CHD5* em outras formações tumorais. Mokarram e colaboradores (2009) analisaram a influência da metilação gene específica em amostras de câncer colo-retal de pacientes iranianos e afro-americanos e, dentre os genes estudados, estava o *CHD5*. A frequência de hipermetilação no promotor do gene *CHD5* foi diferente entre as populações. Foi observado que 47% das amostras de tumor de pacientes iranianos estavam metiladas, enquanto que a frequência de

metilação nas amostras de tumor de afro-americanos foi de 78% ( $p = 0,002$ ). Nenhuma relação significativa entre as características clínico-histopatológicas dos tumores e a frequência de metilação foi observada. Wang e colaboradores (2009) desenvolveram um trabalho analisando a influencia da expressão de *CHD5* em linhagens celulares de tumores gástricos, assim como o perfil de metilação do promotor do gene em amostras tumorais. Os autores observaram que todas as sete linhagens celulares analisadas apresentaram hipermetilação no promotor do gene *CHD5* e 11 das 15 amostras de tumor analisadas também apresentaram a mesma característica, não sendo detectável hipermetilação deste gene em tecido normal. Assim, os autores concluíram que o *CHD5* atua como um supressor de tumor e que ele é epigeneticamente silenciado em tumores gástricos.

Em 2008, Gorringer e colaboradores desenvolveram um trabalho que analisou a expressão de *CHD5* em câncer de ovário. Foi observada hipermetilação na região promotora do gene *CHD5* em três das seis linhagens celulares estudadas, com 805 das ilhas CpG metiladas. Quando analisaram amostras de tumor primário de ovário, a frequência de metilação foi menor, sendo de 14,5% dos casos. Assim, os autores propõem que a hipermetilação da região promotora do gene *CHD5* está relacionada com a transição de tumor primário para uma forma mais agressiva devido a frequência de hipermetilação estar maior em linhagens celulares do que em amostras de tumores primários.

Somente um trabalho, até então, correlacionava a hipermetilação da região promotora do *CHD5* e câncer de mama. Neste trabalho, foram analisadas linhagens celulares e amostras de tumores primários de mama. Desenvolvido por Mulero-Navarro e Esteller (2008), os resultados mostram que das 4 linhagens celulares de mama estudadas (MCF7, MDA468, MDA-MB231, BT549) somente uma, a MDA231, apresentou hipermetilação no promotor do gene *CHD5*. A expressão de *CHD5* foi altamente prejudicada na linhagem celular MDA231. O trabalho também nos mostra que dentre as 20 amostras de carcinomas mamários analisadas, 2 apresentaram hipermetilação no promotor do gene *CHD5*, resultando em uma frequência de 10% de amostras de carcinoma mamário hipermetiladas para este gene. Assim, Mulero-Navarro e Esteller mostraram que em tumores mamários também existe perda de expressão de *CHD5* em decorrência de hipermetilação em sua região promotora.

Assim, na continuidade deste trabalho, esperamos aumentar o número de amostras estudadas e relacionar os níveis de expressão dos genes estudados com o perfil de metilação encontrados em suas regiões promotoras. Também pretendemos estudar com mais detalhes a expressão e atuação do gene *CHD5* no câncer de mama esporádico.

## CONCLUSÕES

- A região promotora do gene supressor de tumor *TP53* não apresentou perfil de hipermetilação nas amostras analisadas, indicando que outras vias possivelmente estariam interferindo na ação da proteína;

- O gene de reparo *hMLH1* apresentou perfil de hipermetilação em sua região promotora em 21,6% das amostras analisadas, o que indica que a transcrição desta proteína pode ser modulada por alteração no perfil de metilação de sua região promotora em parte dos carcinomas de mama esporádicos;

- A presença de LOH no microssatélite D3S1611 foi correlacionada ( $p = 0,04$ ) com amostras apresentando graduação histológica elevada (Grau de Elston II e III), indicando que a análise de instabilidade neste STR seja um importante fator para verificação da evolução do tumor de mama;

- Foi observado que 15% das amostras apresentaram perfil de hipermetilação na região promotora do gene *CHD5* dentre as 60 analisadas. Novos estudos sobre a importância deste gene na supressão tumoral em câncer de mama devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Sep 18; 2 (9): 947-54.

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 Dec; 38 (4): 201-8.

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

Agrawal AK, Jeleń M, Grzebieniak Z, Zukrowski P, Rudnicki J, Nienartowicz E. Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46 (3): 269-76.

Aguilera A, Gomez-González B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetic* 9. 2008: 204-217.

Almeida LO, Custódio AC, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, Rey JA, Casartelli C. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res*. 2009 Jan 6; 8 (1): 8-18.

Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005 Aug; 110 (2): 178-84.

American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual*. New York, NY: Springer. 2002: 171-180.

Andrew AS, Mason RA, Kelsey KT, Schned AR, Marsit CJ, Nelson HH, Karagas MR. DNA repair genotype interacts with arsenic exposure to increase bladder cancer risk. *Toxicol Lett*. 2009 May 22; 187 (1): 10-4.

Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*. 2007 Feb 9;128(3):459-75.

Bagchi A, Mills AA. The Quest for the 1p36 Tumor Suppressor. *Cancer Res*. 2008; 68: (8).

Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2007; 2 (11): 2649-54.

Baylin SB, Chen WY. Aberrant gene silencing in tumor progression: implications for control of cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005, 70: 427-33. Review.

Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM; SEARCH breast cancer study. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2007; 9 (2): R27.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *OMICS*. 2006 Winter; 10 (4): 429-43. Review.

Bertucci F, Birnbaum D, Gonçalves A. Proteomics of breast 19. carcinoma: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1772-86.

Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK, Hilmarsdottir H, Jonasson JG, Eyfjord JE. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2006; 8 (4): R38.

Black MM, Hankey BF, Barclay TH. Parity as a prognostic factor in young breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Jan; 70 (1): 27-30.

Black MM, Opler SR, Speer FD. Survival in breast cancer in relation to structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surgery Gynecology Obstetrics* 100 (1955) 543-551.

Bland IK, Menck HR, Scott-Conner CEH et al. The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer* 83. 1998: 1262-1273.

Braczkowski R, Nowakowska-Zajdel E, Zubelewicz B, Muc-Wierzgon M, Romanowski W. Genetic testing for breast cancer susceptibility: Polish women's attitudes. *J Exp Clin Cancer Res*. 1998 Sep; 17 (3): 299-302.

Branch P, Hampson R, Karran P. DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1995 Jun 1; 55 (11): 2304-9.

Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest*. 1988; 6 (3): 245-54.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994 Mar 17; 368 (6468): 258-61.

Cai GX, Xu Y, Cai SJ, Shi YQ, Lian P, Peng JJ, Guan ZQ, Du X. Relationship between CpG island methylator phenotype and genetic instability in sporadic colorectal cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2007 Nov; 10 (6): 555-60

Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009 May; 10 (5): 295-304. Review.

Chagpar A, Magliocco A, Kerviche A, Tan L, Walley B, DeCoteau JF. The replication error phenotype is associated with the development of distant metastases in hormonally treated patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Mar 1; 100 (5): 913-9.

Chekhun VF, Kulik GI, Yurchenko OV, Tryndyak VP, Todor IN, Luniv LS, Tregubova NA, Pryzimirska TV, Montgomery B, Rusetskaya NV, Pogribny IP. Role of DNA

hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006 Jan 8; 231 (1): 87-93.

Cheng Q, Chen J. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle.* 2010 Feb 6; 9 (3).

Comet B, Cutuli B, Penault-Llorca F, Bonnetterre J, Belkacémi Y. [Male breast cancer. *Bull Cancer.* 2009 Feb; 96 (2): 181-9. Review.

Conde J, Silva SN, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, Gaspar JF. Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. *BMC Cancer.* 2009 Sep 25; 9-344.

Cosse JP, Ronvaux M, Ninane N, Raes MJ, Michiels C. Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide. *Neoplasia.* 2009 Oct; 11 (10): 976-86.

Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000 Feb; 24 (2): 132-8.

Deng Y, Yu B, Cheng Q, Jin J, You H, Ke R, Tang N, Shen Q, Shu H, Yao G, Zhang Z, Qin W. Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Jan 30.

Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002 Feb 8; 295 (5557): 1079-82.

Dregoesc D, Rainbow AJ. Differential effects of hypoxia and acidosis on p53 expression, repair of UVC-damaged DNA and viability after UVC in normal and tumor-derived human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Mar 1; 8 (3): 370-82.

Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer*. 2001 May 1; 92 (3): 404-8.

Dua RS, Isacke CM, Gui GP. The intraductal approach to breast cancer biomarker discovery. *J Clin Oncol*. 2006 Mar 1; 24 (7): 1209-16.

Dufloth RM. Carcinoma de mama hereditário em mulheres 42. 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.

Duriseti S, Winnard PT Jr, Mironchik Y, Vesuna F, Raman A, Raman V. HOXA5 regulates hMLH1 expression in breast cancer cells. *Neoplasia*. 2006 Apr; 8 (4): 250-8.

Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet*. 1996 Oct; 33 (10): 814-9.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003 Apr 18; 300 (5618): 455

Edwards A et al. DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification*. Promega Corporation, 31 (1991).

Eisenberg ALA. Sobrevida de cinco anos para pacientes com 6. 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.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 2002 Sep; 41 (3A): 154-61.

Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel JH, Gorin M, Wasielewski M, van den Ouweland A, Merajver SD, Ethier SP, Schutte M. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res*. 2006 Jan 1; 66 (1): 41-5.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 15; 61 (8): 3225-9.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 629-56.

Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 532: 39-49. Review.

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

Feldman M, Stanford R, Catcheside A, Stotter A. The use of a prognostic table to aid decision making on adjuvant therapy for women with early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2002 Sep; 28(6): 615-9.

Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*. 2004 Aug 15; 64 (16): 5527-34.

Franco S, Perez A, Tan-Chiu E, Frankel C, Vogel CL. Response to fulvestrant in heavily pretreated postmenopausal women: a single-center experience. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Nov; 88 (2): 1 03-8.

Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jul 2; 100 (13): 940-9.

Geng X, Wang F, Zhang L, Zhang WM. Loss of heterozygosity combined with promoter hypermethylation, the main mechanism of human MutL Homolog (hMLH1) gene inactivation in non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Tumori.* 2009 Jul-Aug; 95 (4): 488-94.

Gorringe KL, Choong DY, Williams LH, Ramakrishna M, Sridhar A, Qiu W, Bearfoot JL, Campbell IG. Mutation and methylation analysis of the chromodomain-helicase-DNA binding 5 gene in ovarian cancer. *Neoplasia.* 2008 Nov; 10 (11): 1253-8.

Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2005 Jun 1; 103 (11): 2241-51.

Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res.* 2001 May 15; 61 (10): 4092-7.

Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* 2008 Feb 20; 27 (4): 589-605.

Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (5): 213-8.

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

Holm TM, Jackson-Grusby L, Brambrink T, Yamada Y, Rideout WM 3rd, Jaenisch R. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell.* 2005 Oct; 8 (4): 275-85. Erratum in: *Cancer Cell.* 2005 Nov; 8 (5): 433.

Hsieh J, Fire A. Recognition and silencing of repeated DNA. *Annu Rev Genet.* 2000; 34: 187-204. Review.

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 Sep; 5 (9): 1154-60.

IARC. International Agency Research of Cancer. Web site: [www.iarc.fr](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 Mar 6-12; 320 (6057): 84-5.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997 Mar 1; 57 (5): 808-11.

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 Apr; 81 (4): 573-9.

Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Clinical significance of epigenetic inactivation of hMLH1 and BRCA1 in Tunisian patients with invasive breast carcinoma. *J Biomed Biotechnol.* 2009: 369129.

Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 681-710.

Kuukasjärvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 1996 Sep; 14 (9): 2584-9.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin SX, Pelletier G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev.* 2003 Apr;24 (2): 152-82. Review.

Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet.* 2005 Apr 15; 14 Spec No 1: R65-76.

Leal Rojas P, Anabalón Rodríguez L, García Muñoz P, Tapia Escalona O, Guzmán González P, Araya Orostica JC, Villaseca Hernández M, Roa Strauch JC. Promoter hypermethylation gene patterns in gynecological tumors. *Med Clin (Barc).* 2009 Mar 21; 132 (10): 371-6.

Li M, Liu L, Wang Z, Wang L, Liu Z, Xu G, Lu S. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep.* 2008 Feb; 19 (2): 401-6.

Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet.* 1995 Jan; 9 (1): 48-55.

Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2008 Dec; 9 (12): 1879-902.

Loeb LA, Monnat RJ Jr. DNA polymerases and human disease. *Nat Rev Genet.* 2008 Aug; 9 (8): 594-604.

Martin L, Coffey M, Lawler M, Hollywood D, Marignol L. DNA mismatch repair and the transition to hormone independence in breast and prostate cancer. *Cancer Lett.* 2010 May 28; 291 (2): 142 - 9.

Mastrocola AS, Heinen CD. Nuclear reorganization of DNA mismatch repair proteins in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2010 Feb 4;9(2):120-33. Epub 2009 Dec 8.

Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, 39. cytokeratin 5, and P-cadherin: three markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005; 447 (4): 688 -9 4.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16 (1988): 1215-19.

Ministério da Saúde/ INCA. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2009).

Mokarram P, Kumar K, Brim H, Naghibalhossaini F, Saberi-firoozi M, Nouraie M, Green R, Lee E, Smoot DT, Ashktorab H. Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. *PLoS One.* 2009 Sep 11; 4 (9): e7012.

Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 2003 Dec; 1 (14): 1001-8. Review.

Mulero-Navarro S, Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics.* 2008 Jul-Aug; 3 (4): 210-5.

Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006 Jun; 13 (6): 962-72. Review.

Naqvi RA, Hussain A, Deo SS, Kukreti H, Chauhan M, Sarin R, Saxena A, Asim M, Shukla NK, Husain SA, Pasha ST, Basir SF. Hypermethylation analysis of mismatch repair genes (hmlh1 and hmsh2) in locally advanced breast cancers in Indian women. *Hum Pathol.* 2008 May; 39 (5): 672-80.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2004 Sep; 4 (9): 665-76. Review.

Nayak BK, Das BR. Mutation and methylation status of p53 gene promoter in human breast tumours. *Tumour Biol.* 1999 Nov-Dec; 20 (6): 341-6.

Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM. Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene*. 2008 Jan 31; 27 (6): 803-10.

Ozer E, Yuksel E, Kizildag S, Sercan O, Ozen E, Canda T, Sakizli M. Microsatellite instability in early-onset breast cancer. *Pathol Res Pract*. 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 Mar-Apr; 55 (2): 74-108.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees 31. CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406 (6797): 747-52.

Plisiecka-Hałasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Kraszewska E, Dańska-Bidzińska A, Kupryjańczyk J. Plisiecka-Hałasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Kraszewska E, Dańska-Bidzińska A, Kupryjańczyk J. Loss of heterozygosity, microsatellite instability and TP53 gene status in ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 2008 Mar-Apr; 28 (2A): 989-96.

Radpour R, Barekati Z, Haghghi MM, Kohler C, Asadollahi R, Torbati PM, Holzgreve W, Zhong XY. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 Jan 15.

Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Mar; 59 (3): 225-31.

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer*. 2000 May 15; 88 (10): 2398-424.

Roa JC, Anabalón L, Tapia O, Martínez J, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Roa I. Promoter methylation profile in breast cancer. *Rev Med Chil.* 2004 Sep; 132 (9): 1069-77

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug; 6 (8): 597-610.

Ross JS, Cheung C, Sheehan C, del Rosario AD, Bui HX, Fisher HA. E-cadherin cell-adhesion molecule expression as a diagnostic adjunct in urothelial cytology. *Diagn Cytopathol.* 1996 Jun; 14 (4): 310-5.

Rubbi CP, Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.* 2003 Feb 17; 22 (4): 975-86.

Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer.* 2007 Feb 15; 109 (4): 703-12.

Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakbani SR. Molecular evolution of breast cancer. *Journal of Pathology* 205. 2005: 248-254.

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

Singletary SE, Connolly JL. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer Journal for Clinicians* 56 (2006) 37-47.

Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007 Jan 6; 369 (9555): 29-36.

Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001 Oct; 11 (5): 339-52.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8; 100 (14): 8418-23.

Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et 23. al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:127.

Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer.* 2004 Dec; 40 (18): 2667-75. Review.

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 Apr 17;265(15):1985-90. Erratum in: *JAMA* 1991 Sep 11; 266 (10): 1362.

Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Mar; 7 (3): 165-8.

Szyf M. The DNA methylation machinery as a therapeutic target. *Curr Drug Targets.* 2000 Jul; 1 (1): 101-18.

Takwi A, Li Y. The p53 Pathway Encounters the MicroRNA World. *Curr Genomics.* 2009 May; 10 (3): 194-7.

Van Zee KJ, Calvano JE, Bisogna M. Hypomethylation and increased gene expression of p16INK4a in primary and metastatic breast carcinoma as compared to normal breast tissue. *Oncogene.* 1998 May 28; 16 (21): 2723-7.

Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1979 Nov 1; 52( 1): 1-54. Review.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993 Apr; 9 (4): 138-41

Wang X, Lau KK, So LK, Lam YW. CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *J Biomed Sci.* 2009 Oct 19; 16: 95.

Wäster PK, Ollinger KM. Redox-dependent translocation of p53 to mitochondria or nucleus in human melanocytes after UVA- and UVB-induced apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2009 Jul; 129 (7): 1769-81.

Weimberg RA. *Biology of cancer.* Garland Science; 1 Pap/Cdr/ edition (June 7, 2006)

Widschwendter A, Müller HM, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15; 10 (2): 565-71.

Widschwendter A, Müller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G, Mueller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2004 May; 93 (2): 407-16.

Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006 May; 4 (5): 339-49.

Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer.* 2006 Aug 23; 6:212.

Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Jun; 8 (2): 115-27. Review.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997 Aug; 13 (8): 335-40.

Yoo CB, Jones P. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (2006): 37-50.

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