



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lucas Delmonico Rodrigues da Silva

**Pesquisa de marcadores circulantes em lesões impalpáveis da mama:
alterações somáticas e epigenéticas**

Rio de Janeiro

2014

Lucas Delmonico Rodrigues da Silva

Pesquisa de marcadores circulantes em lesões impalpáveis da mama: alterações somáticas e epigenéticas

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Gilda Alves Brown

Rio de Janeiro

2014

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

S586 Silva, Lucas Delmonico Rodrigues da.
Pesquisa de marcadores circulantes em lesões impalpáveis da
mama: alterações somáticas e epigenéticas. / Lucas Delmonico
Rodrigues da Silva – 2014
158 f.

Orientadora: Gilda Alves Brown.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências
Médicas.

1. Mamas – Câncer - Teses. 2. Mamas – Câncer – Diagnóstico -
Teses. 3. Genes P53 - Teses. 4. Detecção Precoce do Câncer. I.
Brown, Gilda Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 618.19-006.6

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

Assinatura

Data

Lucas Delmonico Rodrigues da Silva

**Pesquisa de marcadores circulantes em lesões impalpáveis da mama: alterações
somáticas e epigenéticas**

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

Aprovada em 28 de novembro de 2014.

Orientadora: Prof.^a Dra. Gilda Alves Brown
Instituto Nacional de Câncer

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Maurício Augusto Silva Magalhães Costa

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, pelo amor e cumplicidade. À todas as mulheres portadoras de câncer de mama, em especial as participantes deste trabalho, que demonstraram ao longo dessa jornada, força, perseverança e não mediram esforços para contribuir com o trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me guiando e auxiliando. Diante dos diversos obstáculos, agradeço por torná-los motivos de perseverança e aprendizado.

Aos mais confiantes da minha vida, aos meus pais, Ilda e Jorge Joel, que mesmo em momentos de hesitação, de desistência, dúvidas e motivos de frustrações foram os melhores conselheiros e amigos. Agradeço o auxílio, o apoio, a dedicação e por terem depositado em mim o mais simples sentido da vida: o amor.

Ao meu irmão André, peço desculpas. Agradeço por entender os motivos de minha ausência e ter acreditado que diante das dificuldades nós sempre seremos o apoio um do outro. Valeu cara!

A minha orientadora Dra. Gilda Alves, pessoa ímpar. Obrigado por ter aceitado um "estrangeiro" em seu laboratório e ter apostado as melhores "moedas" no meu trabalho. Obrigado pelos ensinamentos e paciência pelos atrasos que cometo.

A professora Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza, por ter movido "montanhas" para minha permanência no Rio de Janeiro e ter confiado no meu trabalho. Sem sua ajuda, parte deste trabalho não teria se concretizado. Um obrigado repleto de gratidão.

A professora Dra. Carolina Maria de Azevedo pelo seu apoio, paciência e mansidão no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu grande companheiro, amigo e apoio, Gustavo Santos Oliveira, pelos conselhos, paciência, carinho, e além de tudo, estar sempre ao meu lado. Obrigado pelas palavras e o melhor silêncio na hora que preciso.

As minhas eternas amigas, Daniele, Janine e Natália por serem as piores dentre as melhores. Sem a acidez feminina grande parte dos meus dramas não passaria de certos mimos.

A todos os ex e alunos do antigo Laboratório de Genética Aplicada (INCA): Ana Sheila, Beatriz, Camila, Deodato, Lívia, Marco Felipe, Mariana, Maryah, Paulo, Rafaele, Romulo, Vanessa e Vivian. Obrigado pelos ensinamentos e diversões à parte! Em especial, aos alunos que fazem e fizeram parte do grupo de mama.

A todos do departamento de Patologia Geral (UERJ) pelos ensinamentos e companhias mais que agradáveis. Em especial à Carolina, pelas diversas gargalhadas e inúmeros experimentos. Nem os melhores resultados se comparam as horas e momentos compartilhados com você neste mestrado. Estou na torcida!

Aos amigos do Rio de Janeiro: Bernardo, Carlinhos, Elton, Junior e Rogério pelas diversas encheções de "saco" e por terem me tirado diversas vezes de casa, quando parecia não haver mais vida. Vocês tornam a estadia no Rio muito mais agradável.

Aos órgãos financiadores: Programa de Oncobiologia, MS e FAPERJ. Sem o apoio e incentivo à pesquisa este trabalho não poderia ter sido realizado.

Não sei...

Se a vida é curta ou longa demais pra
nós, mas sei que nada do que vivemos
tem sentido, se não tocamos o coração
das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe,
braço que envolve, palavra que conforta,
silêncio que respeita, alegria que contagia,
lágrima que corre, olhar que acaricia,
desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o
que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não seja nem
curta, nem longa demais, mas que seja
intensa, verdadeira, pura.

Enquanto durar!

Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

SILVA, Lucas Delmonico Rodrigues da. **Pesquisa de marcadores circulantes em lesões impalpáveis da mama**: alterações somáticas e epigenéticas. 2014. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A detecção precoce do câncer de mama aumenta consideravelmente as chances de cura, porém a identificação de lesões iniciais e impalpáveis ainda é um desafio. A mamografia é direito público da mulher somente após os 50 anos de idade segundo o Ministério da Saúde, o que contribui para um diagnóstico tardio, com lesões já palpáveis e de estadios avançados. Além disso, o processamento das imagens é alvo constante de erros de interpretação e resultados equivocados. A busca por marcadores tumorais circulantes vem sendo amplamente explorada na tentativa de minimizar tratamentos agressivos e contribuir para a detecção precoce do câncer de mama. A dificuldade na clínica é determinar com segurança quais os marcadores moleculares seriam capazes de diferenciar as lesões benignas autênticas, das pré-malignas e das malignas. O câncer de mama é consideravelmente heterogêneo e com desfechos clínicos variáveis, não sendo possível determinar a evolução da lesão mamária e o fenótipo das células tumorais. Os genes supressores tumorais têm se tornado os principais candidatos a marcadores, devido à frequência de alterações detectadas em cânceres de mama. O objetivo do trabalho foi investigar dentre o conjunto de genes supressores, aqueles com maiores taxas de mutações somáticas e alterações epigenéticas constantes em lesões ainda em processo inicial. A análise da região codificante dos genes *TP53* (4-9) e *CDKN2A* (1-3) foi realizada em 62 amostras, das quais 21 tiveram histopatológico final de benignidade, e 41 de malignidade. Nenhuma mutação foi encontrada por sequenciamento automático nestes genes. A avaliação epigenética dos genes *TP53*, *CDKN2A* e *ATM* nas lesões impalpáveis, sangue e saliva apresentaram resultados diversos. Dentre as 62 lesões mamárias avaliadas 1 (1,6%) foi positiva para *p14^{ARF}*, 3 (4,8%) para *p16^{INK4a}* e 33 (53,2%) para *ATM*. Dentre as 39 amostras de DNA do sangue periférico, 10 (26%) foram positivas para *p14^{ARF}*, 17 (44%) para *p16^{INK4a}* e 16 (41%) para *ATM*. Dos casos de saliva, 1/39 (2,6%) apresentou metilação para *p14^{ARF}*, 6/39 (15,4%) para *p16^{INK4a}* e 9 (23%) para *ATM*. A avaliação estatística não revelou valores significativos quando comparados as variáveis clínicas das pacientes. As lesões avaliadas conferem com o estágio precoce da carcinogênese mamária e vêm corroborar com a literatura que determina que as mutações somáticas são frequentes em lesões avançadas, com subtipos histológicos, e fatores de prognóstico mais agressivos. Já os achados epigenéticos, embora sem associação de significância estatística, se destacam pela frequência nos fluidos secundários à lesão mamária e despertam a necessidade de investigação mais refinada.

Palavras-chave: Câncer de mama. Lesões mamárias impalpáveis. Detecção precoce. *TP53*. *CDKN2A*. *ATM*.

ABSTRACT

SILVA, Lucas Delmonico Rodrigues da. **Study of circulating markers in impalpable breast lesions**: somatic and epigenetic changes. 2014. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Early detection of breast cancer increases the chances of cure, but identification of initial and impalpable lesions is still a challenge. Mammography is public right of women only after age 50 according to the MS, which contributes to late diagnosis, with longer palpable lesions and advanced stage. In addition, the image processing is a constant target of misinterpretation and misleading results. The search for circulating tumor markers has been widely explored in an attempt to minimize aggressive treatments and contribute to early detection of breast cancer. The difficulty in practice is determine the molecular markers that would be able to differentiate authentic benign of premalignant and malignant lesions. Breast cancer is considerably heterogeneous and with variable clinical outcomes, it is not possible to determine the evolution of the breast lesion and the phenotype of tumor cells. Tumor suppressor genes have become the main candidate markers, because the frequency of abnormalities detected in breast cancers. The aim of the study was to investigate among the set of suppressor genes, those with higher rates of somatic mutations and epigenetic changes contained in carcinogenic initial process. Analysis of the coding region of *TP53* (4-9), and *CDKN2A* (1-3) genes was carried out on 62 samples, 21 of which were benign and 41 malignant. No mutation was found by direct sequencing these genes. Epigenetic assessment of *TP53*, *CDKN2A* and *ATM* genes in non palpable lesions, blood and saliva showed variants results. Among the 62 breast lesions assessed 1 (1.6%) was positive for *p14^{ARF}*, 3 (4.8%) for *p16^{INK4a}* and 33 (53.2%) for *ATM*. Of the 39 DNA samples from peripheral blood, 10 (26%) were positive for *p14^{ARF}*, 17 (44%) for *p16^{INK4a}* and 16 (41%) for *ATM*. Saliva cases, 1/39 (2.6%) had methylation to *p14^{ARF}*, 6/39 (15.4%) for *p16^{INK4a}* and 9 (23%) for *ATM*. Statistical analysis revealed no significant values compared the clinical variables of the patients. Of the lesions conferring with early stage of breast carcinogenesis and corroborate with the data of literature which somatic mutations are frequent in advanced lesions, with histologic subtypes and prognosis more aggressive. Already epigenetic findings, although no association of statistical significance was found, are determinants the methylation frequency in secondary fluid and awaken the need for research on a sample size greater that the analyzed.

Keywords: Breast cancer. Impalpable lesions. Early detection. *TP53*. *CDKN2A*. *ATM*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura mamária e divisões funcionais.....	19
Figura 2 –	Exame mamográfico.....	33
Figura 3 –	Exame ultrassonográfico.....	34
Figura 4 –	Mecanismo de metilação em células normais e carcinogênicas.....	44
Figura 5 –	Estrutura de domínios funcionais da proteína p53.....	46
Figura 6 –	Regiões de “hotspots” no gene <i>TP53</i>	47
Figura 7 –	Estrutura do gene <i>CDKN2A</i>	48
Figura 8 –	Representação da região promotora do gene <i>ATM</i>	60
Figura 9 –	Eletroferograma de análise dos exons 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D) do gene <i>TP53</i>	70
Figura 10 –	Eletroferograma de análise dos exons 1 (A), 2 (B) e 3 (C) do gene <i>CDKN2A</i>	71
Figura 11 –	Perfil de metilação de <i>p14^{ARF}</i> e <i>p16^{INK4a}</i> em gel de poliacrilamida não desnaturante corado por prata.....	72
Figura 12 –	Análise do perfil de metilação de <i>p14^{ARF}</i> em DNA extraído de sangue periférico e saliva, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por prata.....	73
Figura 13 –	Análise do perfil de metilação de <i>p16^{INK4a}</i> em DNA extraído de sangue periférico (A) e saliva (B), a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por prata.....	73
Figura 14 -	Análise do perfil de metilação da região promotora do gene <i>ATM</i> em lesão mamária, sangue e saliva dos casos avaliados, e revelados em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por nitrato de prata.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Lesões benignas não neoplásicas da mama.....	21
Quadro 2 –	Lesões benignas neoplásicas da mama.....	22
Quadro 3 –	Fatores considerados de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.....	24
Quadro 4 –	Distribuição proporcional dos dez principais tumores incidentes estimados para os anos de 2014-2015.....	25
Quadro 5 –	Tipos principais de carcinomas mamários invasivos e suas características.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Categoria BIRADS.....	36
Tabela 2 -	Sequência de iniciadores do gene <i>TP53</i>	55
Tabela 3 -	Sequência de iniciadores do gene <i>CDKN2A</i>	56
Tabela 4 -	Iniciadores dos promotores de <i>p14^{ARF}</i> , <i>p16^{INK4a}</i> e <i>ATM</i> , metilados e não metilados.....	62
Tabela 5 -	Dados socio-clínico dos casos estudados.....	65
Tabela 6 -	Distribuição histológica dos tumores avaliados.....	67
Tabela 7 -	Marcadores imunoistoquímicos para as lesões malignas avaliadas.....	68
Tabela 8 -	Perfil clínico e histopatológico dos casos triplo-negativos.....	69
Tabela 9 -	Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para <i>p14^{ARF}</i>	74
Tabela 10 -	Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para <i>p16^{INK4a}</i>	74
Tabela 11 -	Distribuição global dos casos metilados para <i>p14^{ARF}</i> e <i>p16^{INK4a}</i>	75
Tabela 12 -	Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para <i>ATM</i>	76
Tabela 13 -	Distribuição dos casos metilados para a região promotora de <i>ATM</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Radiology</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BIRADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
CEMO	Centro Especializado em Médula Óssea
CI	Carcinoma Intraductal
CLI	Carcinoma Lobular Infiltrante
CLIS	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
CMI	Carcinoma Micropapilar Invasivo
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNMTs	DNA Metiltransferases
EDTA	Etilenodiamino Tetra-Acético
HA	Hiperplasia Atípica
HE	Hematoxilina Eosina
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor- 2</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
M100	Marcador de 100 pares de base
MA	Mamografia
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tampão Tris-Amino-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UICC	Unidade Internacional Contra o Câncer
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

G	Unidade de rotação gravitacional
L	Litro
M	Concentração Molar
mM	Concentração em mili molar
mL	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade internacional
V	Volts
μL	Microlitro
α	alpha

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	50
1.1	Geral	50
1.2	Específicos	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	População de estudo	51
2.2	Obtenção das amostras	51
2.3	Extração do material genômico	52
2.3.1	<u>Tecido tumoral</u>	52
2.3.2	<u>Sangue</u>	52
2.3.3	<u>Saliva</u>	53
2.4	Eletroforese do DNA genômico	54
2.5	Investigação mutacional no gene supressor tumoral <i>TP53</i>	54
2.5.1	<u>Reação em cadeia pela polimerase do gene <i>TP53</i></u>	54
2.6	Investigação mutacional no gene supressor tumoral <i>CDKN2A</i>	56
2.6.1	<u>Reação em cadeia pela polimerase do gene <i>CDKN2A</i></u>	56
2.7	Eletroforese em gel de agarose 1,5%	57
2.8	Purificação do produto de amplificação dos genes <i>TP53</i> e <i>CDKN2A</i>	57
2.9	Quantificação	58
3	SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO	58
3.1	Modificação do DNA com Bissulfito de sódio	59
3.1.1	<u>Reação em cadeia pela polimerase do gene <i>CDKN2A</i> (<i>p14^{arf}</i> e <i>p16^{INK4a}</i>) e <i>ATM</i> (<i>MSP –Methylation Specific PCR</i>)</u>	60
3.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida vertical 10% não-desnaturante	62
3.3	Deteção do material amplificado por coloração com nitrato de prata	63
3.4	Avaliação estatística	63
4	RESULTADOS	65
4.1	Perfil clínico das pacientes	65
4.2	Análise das sequências do gene <i>TP53</i>	70
4.3	Análise das sequências do gene <i>CDKN2A</i>	71

4.4	Perfil de metilação de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$	72
4.5	Perfil de metilação da região promotora do gene ATM.....	76
5	DISCUSSÃO.....	79
5.1	Perfil molecular do gene supressor tumoral $TP53$ em lesões BI-RADS 4.....	80
5.2	Perfil molecular do gene supressor tumoral $CDKN2A$ em lesões BI-RADS 4	81
5.3	Epigenética na carcinogênese mamária.....	84
5.4	Metilação de $p14^{ARF}$	85
5.5	Metilação de $p16^{INK4a}$	87
5.6	Metilação de ATM.....	90
5.7	Investigação de metilação em $p14^{ARF}$, $p16^{INK4a}$ e ATM	93
	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	115
	ANEXO B – Aprovação do comitê de ética em pesquisa INCA.....	120
	ANEXO C – Aprovação do comitê de ética em pesquisa HUGG.....	121
	ANEXO D – Avaliação estatística de $p14^{ARF}$	122
	ANEXO E - Avaliação estatística de $p16^{INK4A}$	125
	ANEXO F - Avaliação estatística de ATM.....	129
	ANEXO G – Aceite de 1º publicação de artigo científico.....	133
	ANEXO H – Artigo 1.....	134
	ANEXO I – Aceite de 2º publicação de artigo científico.....	146
	ANEXO J – Artigo 2.....	147

INTRODUÇÃO

Aproximadamente cerca 57 mil novos casos de câncer de mama no Brasil são esperados para os anos de 2014-2015. Somente no ano de 2011 foram confirmados 13.225 mortes, em decorrência desta neoplasia. Corresponde a 22% de todos os cânceres que acometem as mulheres anualmente, e tem se tornado uma das patologias mais bem exploradas, com perfil heterogêneo e taxa de mortalidade elevada (MS, 2014).

As lesões impalpáveis representam uma patologia mamária singular, sem estimativas seguras para predizer quais casos serão confirmados como malignos. Bastante peculiar estas lesões passam despercebidas aos exames de triagem, pois por serem muito pequenas e de difícil distinção é mascarada pelo contraste do tecido adiposo e gânglios da mama (Badra *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2010; Schnitt & Collins, 2010). O exame clínico e a mamografia são os métodos de escolha para o diagnóstico precoce, sendo esta última essencial na detecção das lesões impalpáveis (Schnitt & Collins, 2010).

Badra *et al.*, (2006) referem-se a estas lesões como menos agressivas, infiltração nodal e metástases distantes raras, quando diagnosticadas em estágio inicial. Ainda assim, cerca de 50% destes casos, a mamografia apresenta microcalcificações, e adjuvamente aos marcadores de prognóstico (grau histológico do tumor, envolvimento linfonodal e infiltrativo), não são suficientes para destacar a complexidade molecular e clínica das lesões impalpáveis (Roubidou *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2004).

Numa tentativa de diminuir o índice de mortalidade e contribuir para a detecção precoce destas lesões, em especial distingui-las quanto à origem e evolução (benignas, pré-malignas e malignas), novas ferramentas têm sido testadas tanto no âmbito de diagnóstico por imagem quanto genético (Karamouziz *et al.*, 2002, Roubidou *et al.*, 2004, Badra *et al.*, 2004).

De um modo geral, somente os tecidos confirmados como lesões malignas, e obtidos a partir da cirurgia, que são pesquisados, ou seja, lesões mamárias já consideradas palpáveis. Assim, há um vácuo enorme de informações sobre o mecanismo molecular das lesões impalpáveis, justamente por diferenciarem das demais quanto a sua evolução. Nem sempre as lesões impalpáveis apresentam um fenótipo, e perfil molecular similar, especialmente quanto ao prognóstico (Heimann & Hellman, 2000).

As assinaturas genéticas, ou os chamados testes de painel de expressão genética, têm sido utilizados no decorrer dos últimos anos, como forma de minimizar procedimentos

clínicos agressivos. Porém, nem sempre estes testes são suficientes, justamente pelas margens de erros em decorrência da heterogeneidade do tumor.

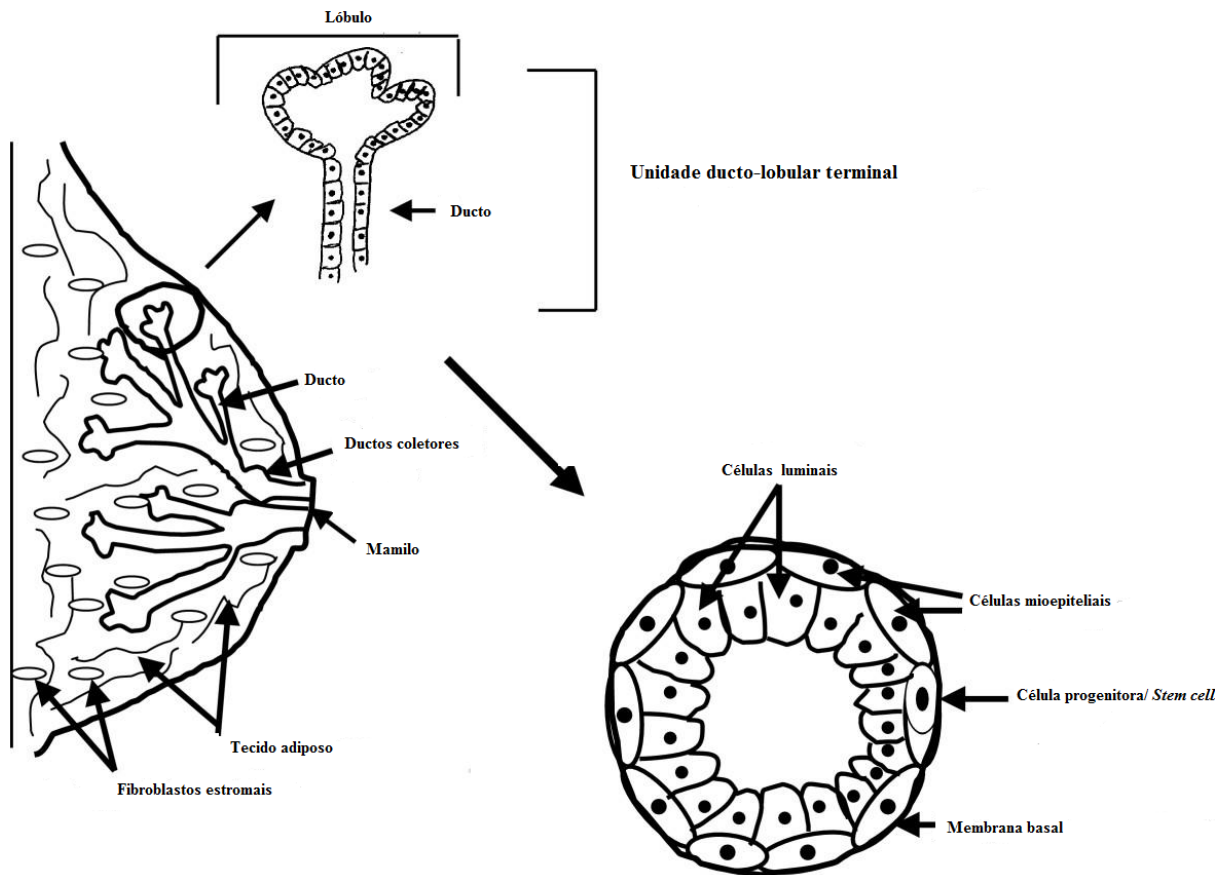
Alterações sistêmicas podem ser confirmadas pela presença de células tumorais circulantes, mesmo em tumores não metastáticos, além de que as células imunológicas sofrem pequenas alterações moleculares que podem ser detectadas mesmo antes do diagnóstico da massa tumoral (Flanagan *et al.*, 2009; Andergassen *et al.*, 2013). Essas mutações e alterações epigenéticas podem ser detectadas a partir do sangue e ou em demais fluidos.

A utilização de marcadores moleculares pode ser empregada para a detecção precoce, promoção da vigilância, e resistência imunológica do paciente. A investigação de alterações genéticas e epigenéticas nas lesões impalpáveis poderão constituir uma ferramenta útil, a ponto de se entender os mecanismos envolvidos no processo inicial da carcinogênese e auxiliar no diagnóstico e procedimentos terapêuticos.

Glândula Mamária

A glândula mamária é constituída pela ramificação do sistema ductal e finalizada na unidade ducto-lóbulo terminal. O arcabouço mamário é composto por estruturas acinares envolto por um estroma de tecido adiposo, e tecido fibroso (Figura 1). Dentre este estroma é possível encontrar células progenitoras nos sistemas luminais, responsáveis pela manutenção e renovação do tecido epitelial mamário (Cardiff *et al.*, 1999; Dimri *et al.*, 2005).

Figura 1 - Estrutura mamária e divisões funcionais



Fonte: Modificado de Dimri *et al.*, 2005

A estrutura mamária adulta é formada por três grandes tecidos: pele, tecido subcutâneo, e tecido mamário propriamente dito. O parênquima mamário é subdividido em cerca de 15-20 segmentos que convergem ao mamilo em um posição radial. Os ductos coletores que drenam cada um destes segmentos tem em média 2 mm de diâmetro. Cada segmento capta a secreção de 20-40 lóbulos mamários que podem conter de 10-100 unidades funcionais (Moffat & Going, 1996; Osborne & Boolbol, 2010).

O complexo mamário ainda possui uma rede linfática funcional que age como dreno para a mama. Os plexos linfáticos subepiteliais e os papilares são confluentes com os linfonodos subepiteliais distribuídos pela superfície do corpo. Estima-se que cerca de 97% do fluxo linfático da mama tem destino para a rede linfática das axilas. Este fator é responsável pela pesquisa dos linfonodos sentinelas, assim como a via principal de propagação das células tumorais de metástase à distância (Hultborn *et al.*, 1955; Osborne & Boolbol, 2010).

Lesões benignas da mama

Determinado por um grupo extenso de patologias, as lesões benignas são ditas como um problema na patologia investigativa, pois compartilham da suspeita de lesões malignas quando muito pequenas, e aumentam a margem de suspeita para um tumor infiltrativo (Schnitt & Collins, 2010).

Segundo Schnitt & Collins (2010) as doenças benignas da mama são divididas em lesões não-neoplásicas e neoplásicas da mama. As não-neoplásicas podem ser: anomalias do desenvolvimento, doenças inflamatórias, doenças relacionadas à lactação, alterações não proliferativas (alterações fibrocísticas), lesões proliferativas, lesões de células colunares, hiperplasia pseudo-angiomatóide e hamartomas (quadro 1).

Dentre as lesões não-neoplásicas e não-proliferativas, os cistos, uma das lesões mais comuns deste grupo, são caracterizados por serem estruturas arredondadas preenchidas por líquido, e de tamanhos variados. Microscopicamente são derivados de um ducto terminal, e apresentam duas camadas celulares, uma advinda do epitélio lobular e outra camada de células mioepiteliais (Schnitt & Collins 2010). Outra lesão que merece enfoque dentre esta classificação são as ectasias ductais, pois cerca de 75% dos casos são ocultos e de massas não palpáveis. Acometem tanto mulheres na peri quanto na pós-menopausa, e geram descargas mamilares que podem variar no aspecto, podendo ser do tipo serosa, sanguinolenta ou amarelada. Morfologicamente são resultados de acúmulo de líquido secretado com dilatação progressiva do ducto maior gerando um infiltrado rico em linfócitos e macrófagos (Schmitt & Gobbi, 2006).

Quadro 1 - Lesões benignas não neoplásicas da mama

<i>Anomalias do desenvolvimento</i>
Amastia e hipoplasia
Macromastia (hipertrofia mamária)
Ectopia e remanescentes da linha mamária
<i>Doenças inflamatórias</i>
Mastites agudas e crônicas
Abscesso subareolar recidivante
Ectasia ductal
Lobulite linfocítica
Reações à prótese mamária
<i>Doenças relacionadas à lactação</i>
<i>Lesões não-proliferativas (alterações fibrocísticas)</i>
Cistos
Alterações apócrinas papilares
Alterações estromais
Fibrose
Elastose
<i>Lesões proliferativas</i>
Adenose
Hiperplasia ductal (usual ou sem atipias e atípicas)
Hiperplasia lobular atípica
Cicatriz radial/lesão esclerosante complexa
<i>Lesões de células colunares</i>
Alterações de células colunares
Hiperplasias de células colunares sem atipias
Alteração de células colunares com atipias (“atipia plana”)
Hiperplasia de células colunares com atipias (“atipia plana”)
<i>Hiperplasia pseudo-angiomatóide</i>
<i>Hamartomas</i>

Fonte: Modificado de Schmitt & Gobbi (1991) e Schmitt & Gobbi (2006)

O segundo grupo, denominado das lesões benignas neoplásicas pode ser dividido em: tumores epiteliais, tumores mistos epiteliais e conjuntivos (neoplasias fibroepiteliais), tumores mesenquimais e tumores ditos cutâneos (Quadro 2) (Schmitt & Gobbi, 2006).

Quadro 2 - Lesões benignas neoplásicas da mama

<i>Tumores epiteliais</i>
Papiloma: único e múltiplo
Adenoma: tubular e da lactação
Papilomatose (adenoma) florida do mamilo
Adenomioepitelioma
<i>Tumores mistos epiteliais e conjuntivos (neoplasias fibroepiteliais)</i>
Fibroadenoma
Tumor <i>phyllodes</i>
<i>Tumores Mesenquimais</i>
Lipoma
Hemangioma
Fibromatose
Miofibroblastoma
Neurofibroma
Leiomioma
Tumor de células granulares
<i>Outros</i>
Tumores cutâneos

Fonte: Modificado de Schmitt & Gobbi (1991) e Schmitt & Gobbi (2006)

Dentre as lesões proliferativas sem atipias, o fibroadenoma acomete mulheres desde a menarca à senilidade (Schnitt & Collins, 2010). Apresenta desenvolvimento sobre o lóbulo mamário estendendo sua evolução até a formação de um nódulo sólido. É comum em mulheres jovens em idade reprodutiva, pois parece haver uma sensibilidade aumentada ao hormônio estrogênio; e em mulheres negras tende a formar lesões múltiplas e bilaterais.

Geralmente varia entre 1-3cm de tamanho, podendo atingir faixas superiores a 5 cm, nestes casos são denominados de fibroadenomas gigantes (Ashutosh *et al.*, 2013).

Dentre os fibroadenomas existem outras variações quanto à histopatologia, podendo ser subdivididos em: fibroadenomas complexos, fibroadenomas juvenis, fibroadenomas gigantes, fibroadenomas tipo infarto (êmbolo e obstrução dos vasos sanguíneos, acarretando em necrose do tecido mamário), fibroadenomas associados com hiperplasias e ainda fibroadenomas associados com carcinoma (Schnitt & Collins, 2010).

Tumores malignos da mama

O câncer de mama predominantemente é determinado por uma doença de alteração do genoma que surge a partir do acúmulo de aberrações (alterações no número de cópias, mudanças na sequência, e alterações epigenéticas). Numa minoria dos casos de câncer de mama, a predisposição genética é herdada. Nestes casos, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, *TP53*, *CHK2*, *ERBB2* são as mais conhecidas (Spellman *et al.*, 2010).

Os tumores malignos compreendem um grupo bastante heterogêneo com exames de imagem e moleculares distintos. Além destas alterações já pré-determinadas, o câncer de mama é uma convergência de fatores de riscos que podem contribuir, ou serem, responsáveis pelo seu aparecimento.

Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama

Os fatores de risco que influenciam no desenvolvimento do câncer de mama são diversos, alguns passíveis de serem modificados, outros não. Dentre as variáveis, os fatores de risco podem ser divididos em: fatores epidemiológicos, reprodutivos, hormonais internos, hormonais externos pré e pós menopausa, nutricionais, exposição à radiação, exposição ambiental, ocupação (trabalho), histórico médico e fatores genéticos ou herdáveis (Willet *et al.*, 2010). Estes fatores de riscos estão resumidos no quadro 3.

Quadro 3 - Fatores considerados de risco para o desenvolvimento do câncer de mama

<i>Fatores de risco elevado (risco relativo 4 vezes maior)</i>
Idade acima de 50 anos
País de origem (Estados Unidos, norte da Europa e Escandinávia)
História familiar: antecedentes familiares de primeiro grau e história de câncer na pré-menopausa > <i>BRCA 1</i> e <i>BRCA 2</i>
Síndromes genéticas: Li-Fraumeni, ataxia-telangiectasia e outras
Hiperplasia atípica (especialmente quando associada à história familiar)
CLIS
<i>Fatores de risco moderado (risco relativo de 2 a 4 vezes maior)</i>
Qualquer antecedente familiar de câncer de mama
Estimulação estrogênica prolongada: nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, primeira gestação tardia (após 35 anos)
Mutação em <i>CHEK2</i>
História pessoal de câncer do ovário ou do endométrio
Exposição à radiação ionizante
Hiperplasia ductal sem atipia
<i>Fatores de risco baixo (risco relativo de 1 a 2 vezes maior)</i>
Reposição hormonal na menopausa
Ingestão de álcool
Obesidade na pós-menopausa
Estatura elevada na adolescência
História de doença benigna da mama

Fonte: Adaptado de Schmitt & Gobbi (2006) e Burstein *et al.*, (2010)


Incidência, mortalidade e sobrevida do câncer de mama

Em relação aos dados de incidência para câncer de mama no Brasil, estima-se cerca de 57 mil casos para os anos 2014-2015. Nos últimos anos tornou-se a primeira neoplasia que acomete as mulheres, exceto tumores da pele não melanoma (Quadro 4). As taxas de

mortalidade no país são elevadas, com dados confirmados de 13.225 mil mortes somente para o ano de 2011 (MS, 2014).

A sobrevida das pacientes com câncer de mama varia por país, e no Brasil as variáveis intra-regionais estão presentes. Nos EUA a taxa de sobrevida livre da doença após cinco anos é de 83,9%, na Europa 73,1%, e no Brasil uma média de 61%, sendo que nas áreas menos desenvolvidas do país essa taxa pode cair consideravelmente (MS, 2014).

Quadro 4 - Estimativa dos principais neoplasias para os anos de 2014-2015

	Localização primária	casos novos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Nota: Números arredondados por 10, ou múltiplos de 10

Fonte: Adaptado de MS, 2014

Classificação histológica dos tumores malignos

A classificação histológica dos tumores malignos é dividida em ductais e lobulares. Os tumores malignos são determinados pelo crescimento e fatores citológicos das células tumorais. Esta classificação é adotada pela OMS, mas seguem variações dentre a histopatologia, pois nem sempre são possíveis de classificação por possuírem áreas de miscigenação tumoral (Wellings *et al.*, 1975; Dillon *et al.*, 2010).

Os tumores infiltrativos são em maioria associados aos carcinomas *in situ*, e as células de ambas as massas, compartilham de fenótipo celular similar (Moriya *et al.*, 1994; Dillon *et al.*, 2010).

Carcinoma *in situ*

O carcinoma *in situ* é apresentado por duas grandes classificações histológicas: os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) e os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS). Estas lesões são determinadas por agrupamentos celulares bem diferenciados, com localização restrita que confirmam a ausência de invasão de células tumorais no estroma mamário (Allred, 2010).

Carcinoma ductal *in situ*

O CDIS é detectado, em maioria pela mamografia, representando 20-25% das patologias mamárias. Em relação à patologia, apresenta estágio bem diferenciado, a pouco diferenciado, classificados comumente em cinco grupos: comedocarcinoma, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido (Schmitt & Gobbi, 2006).

O tipo comedocarcinoma é caracterizado como o principal tumor *in situ* por conter áreas de necroses extensas que ocupam o interior do ducto, e possuem células tumorais de alto grau nuclear que podem adquirir possibilidades de invasão do estroma; e os micropapilares que possuem tendência à multicentricidade (Schmitt & Gobbi, 2006).

Os CDIS apresentam associações com os marcadores de prognóstico, sendo os tumores bem diferenciados e de baixo grau com elevados níveis de positividade para os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP). Com o aumento de estadios da lesão e diminuição de diferenciação, essa positividade tende a cair em torno de 20% (Van de Vijver *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1991, Allred *et al.*, 2010). No caso do marcador HER (amplificação e superexpressão) e p53 (mutações e superexpressão), estes fenótipos são raros, variando de 5-10% em CDIS bem diferenciados, mas tende a aumentar gradualmente em lesões pouco diferenciadas (60%) (Barnes *et al.*, 1992; Allred *et al.*, 2008; Allred *et al.*, 2010).

Carcinoma lobular *in situ*

Os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS) representam cerca de 20-30% de todos os carcinomas *in situ*, e em maioria achados acidentais durante a realização da mamografia. Atualmente o CLIS é considerado fator de risco para carcinomas invasivos, pois as chances de mulheres portadoras de CLIS vierem a desenvolver um carcinoma lobular invasivo (CLI) são de 1% ao ano, ou seja, após 20 anos, este risco absoluto é estimado em 20% (Schmitt & Gobbi, 2006).

Em relação à histologia, os CLIS são multicêntricos, com baixo grau nuclear e apresentam citoplasma bem delimitado, com aspectos em sinete. As células tumorais se distendem entre os lóbulos e são bastante pequenas, redondas e poucas coesas, devido à perda de expressão gradativa de E-caderina (Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma invasor

Grupo determinado por infiltração tumoral no estroma mamário, independente das associações *in situ*. São divididos em dois grupos: ductais e lobulares e suas respectivas subdivisões (Quadro 5).

Quadro 5 - Tipos principais de carcinomas mamários invasivos e suas características relevantes (continua)

Carcinoma ductal invasor clássico (SOE)

75% dos casos

Grupo heterogêneo

Carcinoma lobular invasor

10% dos casos

Aspecto infiltrativo de células isoladas

Bom prognóstico – variante clássica

Carcinoma tubular

5% dos casos

Quadro 5 - Tipos principais de carcinomas mamários invasivos e suas características relevantes (conclusão)

Formação de túbulos bem diferenciados em estroma fibroelástico

Variante de melhor prognóstico (sobrevida de 5 anos em 95-100% dos casos)

Carcinoma Medular

7% dos casos

Boa delimitação macro e microscópica

Células pleomórficas, estroma escasso, infiltração linfoide

Relacionado a mutações no gene *BRCA1*

Carcinoma Mucinoso

2-3% dos casos

Massa bem delimitada, de aspecto gelatinoso, pacientes idosas

Bom prognóstico, com baixa incidência de metástases axilares

Doença de Paget

Lesão eczematosa do mamilo

Disseminação intra-epidérmica de células malignas

Pode ter um carcinoma invasivo ou intraductal subjacente

Carcinoma Inflamatório

Sinais clínicos: edema, eritema e calor

Embolização tumoral nos linfáticos da derme

Mau prognóstico

Fonte: Modificada de Schmitt & Gobbi, 2006

Carcinoma ductal invasivo

Os carcinomas ductais invasivos (CDI) são caracterizados por massas tumorais em média de 2 a 3 cm de diâmetro. Apresentam-se como massas palpáveis com elevada taxa de multiplicação, e é particularmente endurecida pela densidade irregular, e com microcalcificações frequentes. Macroscopicamente são de superfície amarelada de consistência firme e com trabéculas que irradiam para o centro da lesão. Dentre o tumor

podem coibir áreas de componente *in situ* que comprovam sua função como fator de risco para recidiva (Schmitt & Gobbi, 2006).

Microscopicamente apresentam predomínio de células com núcleos pequenos, cromatina homogênea e poucas mitoses quando em estágio inicial. Estas variáveis podem se acentuar quando a lesão atinge progressões de fenótipo mais agressivo (Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma lobular invasivo

Clinicamente o carcinoma lobular invasivo (CLI) apresenta-se como lesão difusa e com pouca alteração textural, não podendo ser rotineiramente detectada pela mamografia. Representam cerca de 10% de todos os tumores invasivos da mama com sobrevida em 10 anos de 80-90%.

Possui uma maior tendência a bilateralidade com taxa elevada para recidiva sistêmica tardia, metástases variáveis e em diferentes sítios (cavidade pleural, abdominal, pulmonar e etc) (Schmitt & Gobbi, 2006).

No tipo clássico, as células do tumor perdem expressão de E-caderina e são tipicamente de crescimento difuso, fatores estes que podem ser úteis para diferenciação do carcinoma ductal (Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma tubular

Os carcinomas tubulares são detectados como massas espiculadas e representam entre 5-10% dos carcinomas invasivos. São tumores frequentes em casos familiares, especialmente ligados a mutações no gene *BRCA2*. Quando determinados por uma formação tubular pura, apresentam um melhor prognóstico (Schmitt & Gobbi, 2006).

Histologicamente possuem células bem uniformes com ausência de células mioepiteliais, sendo este último um achado de extrema importância para diferenciação dos demais tumores (Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma medular

Correspondem cerca de 1-5% de todos os cânceres invasores da mama e com maior frequência em mulheres jovens. Hipotetiza-se que este tipo histológico tenha uma associação com mutações no gene *BRCA1* (Schmitt & Gobbi, 2006).

O seu aspecto macroscópico reflete características bem clássicas do fibroadenoma, pois se apresenta bem delimitado, lobulado, homogêneo e de consistência macia. Microscopicamente é possível destacar células com núcleos bem pleomórficos, com nucléolos evidentes e estroma bastante enriquecido com infiltrado linfocitário. Focos de metaplasia escamosa e necrose podem estar presentes (Lester, 2004; Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma mucinoso

O carcinoma mucinoso representa cerca de 2-3% dos carcinomas invasores e também é denominado frequentemente por carcinoma gelatinoso, coloide e mucoide. Apresenta-se como um achado não usual dentre as patologias mamárias em mulheres pós-menopausa e possuem um bom prognóstico. Em menos de 20% destes tumores ocorre metástase para o linfonodo (Lester, 2004; Schmitt & Gobbi, 2006).

Macroscopicamente o tumor segue o fenótipo de sua nomenclatura e apresenta-se com aspecto gelatinoso. Na microscopia é determinado por grupamentos de células tumorais com aspecto homogêneo e de baixo grau maligno, sendo em maioria positivo para os receptores hormonais (Lester, 2004; Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma micropapilar

São tumores raros na sua forma pura, porém cerca de 3-6% dos tumores invasivos apresentam focos de arranjos micropapilares no estroma sem revestimento epitelial ou endotelial. São tumores agressivos com metástases axilares comuns e invasão vascular com taxas de até 60% (Lester, 2004; Schmitt & Gobbi, 2006).

Doença de Paget

A doença de Paget é um tumor invasor caracterizado pela eczemia do mamilo, em resposta aos carcinomas intraductais ou subjacentes. A doença de Paget pode ser os primeiros sinais de carcinomas de mau prognóstico e suas células são positivas para HER2 (Schmitt & Gobbi, 2006).

A microscopia é caracterizada por células grandes com citoplasma claro e nucléolos evidentes. O citoplasma possui muco em seu interior, o que lhe confere um diagnóstico mais seguro sendo possível de ser corado por PAS (Schmitt & Gobbi, 2006).

Carcinoma inflamatório

O carcinoma inflamatório não é considerado uma classificação histológica, mas sim uma apresentação clínica quando visto microscopicamente. Este tipo de neoplasia é caracterizada por uma embolização maciça dos vasos linfáticos pelas células neoplásicas e microscopicamente apresentam células com pouca diferenciação. Apresenta prognóstico ruim e localmente edema, vermelhidão e calor (Schmitt & Gobbi, 2006).

Outros carcinomas da mama

Os demais tipos de carcinomas representam menos de 1% dentre as patologias mamárias e incluem carcinomas heterogêneos, desde a histologia à resposta clínica. Os mais raros são os carcinomas adenoides-císticos, carcinomas secretores juvenis, carcinomas papilíferos invasores, carcinomas de células acinares, carcinomas ricos em lipídeos e carcinomas apócrinos (Schmitt & Gobbi, 2006).

Diagnóstico do câncer de mama

A idade de diagnóstico do câncer de mama no Brasil tem diminuído ao decorrer dos anos, devido principalmente ao rastreamento da lesão pela mamografia, e o desenvolvimento de programas assistenciais voltados à saúde da mulher (Liedke *et al.*, 2014).

O diagnóstico do câncer de mama é feito por uma gama de exames que incluem, principalmente, os exames de imagem, os marcadores bioquímicos e os imunoistoquímicos. Além destes, existem os exames de alta tecnologia que incluem imagens em resoluções de 3D e os exames de expressão gênica (*Oncotype*, *Mammaprint* entre outros).

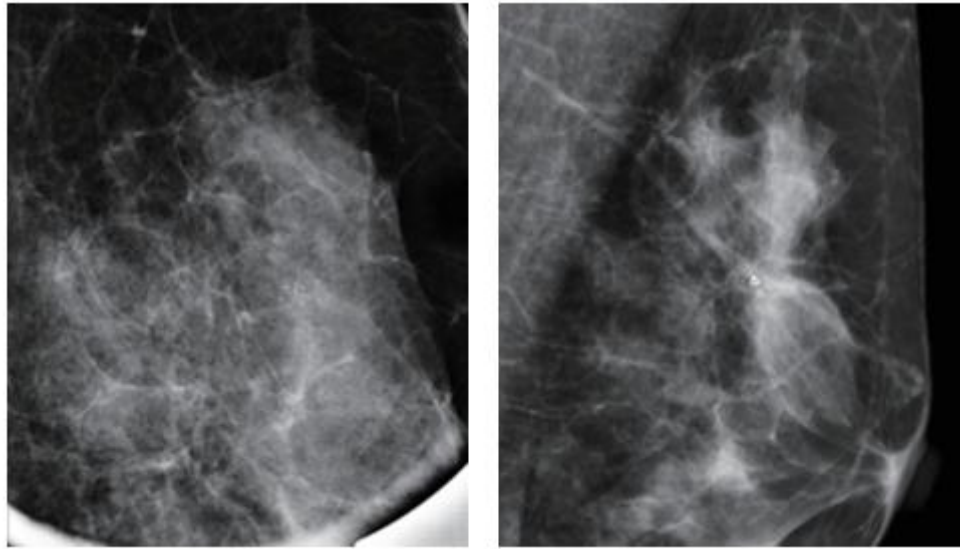
Diagnóstico por imagem

Mamografia

A mamografia (MA) é o único método atualmente considerado referência e adequado para rastreamento de mulheres assintomáticas. A sensibilidade da técnica varia entre 40-73%, com uma especificidade de 35-98%, dependentes da qualidade do equipamento, e da densidade da mama (Beam *et al.*, 2003; Smith, 2007; Heywang-Kobrunner *et al.*, 2008). Mais além, Barlow *et al.*, (2002) relata um número considerável de casos com erros e divergências nos resultados da mamografia, devido principalmente à inexperiência dos radiologistas.

O exame mamográfico é realizado a partir de aparelhos de baixa intensidade de emissão de raios-x. A mama é comprimida sob um receptor de imagem (podendo ser de filme ou digital), e uma base transparente de compressão da mama. Os raios-x não absorvidos marcam o filme, ou são revelados pelo detector digital, produzindo uma fotografia similar a um negativo (Helvie, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Exame mamográfico



Legenda: Mamografia revelando áreas de calcificações dispersas entre o arcabouço mamário.

Fonte: Youn *et al.*, 2014.

A interpretação do exame baseia-se em levar em consideração a detecção das alterações visualizadas no filme, ou no resultado digital. As lesões identificadas são analisadas por vários fatores morfológicos que incluem as calcificações, que aparecem em cerca de 90% das lesões malignas, o volume das massas, a forma, a margem e a densidade da mama (Helvie, 2010). Estas variáveis e distribuições diferenciais exercem papel preditivo para determinação da malignidade da lesão. Entre as variações de destaque podem ser incluídas as calcificações pequenas e dispersas, margens espiculadas, distorções na arquitetura, e variações quanto ao fluido mamário (sanguinolento e seroso) (Adepoju *et al.*, 2005, Helvie, 2010).

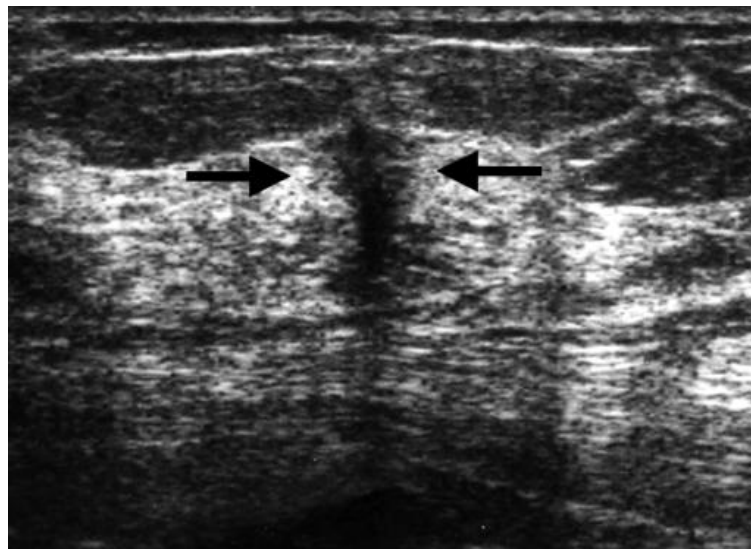
No Brasil, o MS recomenda um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. A Sociedade Brasileira de Mastologia e Radiologia têm questionado essa preconização do MS, defendendo a avaliação mamográfica a partir de 40 anos de idade. Para mulheres com história familiar de câncer de mama, é preconizada a avaliação das mamas a partir dos 35 anos de idade (MS, 2014).

Ultrassonografia

A ultrassonografia (US) tornou-se o exame mais sensível para o diagnóstico das doenças mamárias (Chala & Barros, 2007) com sensibilidade de 92% e especificidade variando entre 90% - 96% (Tejerina *et al.*, 2012).

A técnica baseia-se nos transdutores de ondas com frequência média que varia de 5 para 15 MHz. A resolução da técnica permite sua visualização em profundidade, garantindo sua aplicação em mamas densas e em estágio de lactação. A emissão das ondas sonoras em diferentes ângulos recria a imagem com precisão, possibilitando detectar anormalidades na mama avaliada (Khouri, 2010) (Figura 3).

Figura 3 - Exame ultrassonográfico



Legenda: Ultrassonografia detectando câncer de mama tubular (setas)

Fonte: Heywang-Köbrunner *et al.*, 2008.

A US tem passado por modificações desde sua invenção e atualmente existem aparelhos com tecnologias mais refinadas, como por exemplo, o *Doppler Color* e o ultrassom em 3D, que permitem a visualização da vascularização do arcabouço mamário possibilitando em algumas situações a distinção das lesões malignas das benignas (Del Cura *et al.*, 2005; Khouri, 2010). Tornou-se uma ferramenta valiosa e complementar a mamografia na rotina, em especial, para a detecção de carcinomas não palpáveis e ocultos clinicamente (Kolb *et al.*,

2002; Saarenmaa *et al.*, 2001). Contudo, o seu uso ainda é limitado na clínica, sendo utilizado principalmente em casos em que haja dúvidas sobre o diagnóstico de lesões de difícil distinção. Apresenta-se com maior sensibilidade à mamografia, eliminando em muitos casos procedimentos invasivos, por exemplo, as biópsias por agulha-fina (Parker *et al.*, 2009).

Ressonância Magnética

A ressonância magnética (RM) atualmente é uma técnica utilizada para o acompanhamento do estadiamento local e vigilância da lesão mamária. Possui sensibilidade superior, ou mesmo equiparada a US e especificidade inferior aos demais exames com 88% (Smith, 2007; Debra *et al.*, 2011). É considerado um exame com necessidades de aprimoramentos técnicos para que seja mais amplamente utilizado (Tejerina *et al.*, 2012).

A técnica consiste na secção do tecido analisado em quadros de imagens, com a recriação do movimento dos prótons, de acordo com o relaxamento do tecido. O uso da RM no diagnóstico do câncer de mama ainda é limitado especialmente em pacientes jovens com mamas densas e genes *BRCA1* ou *BRCA2* mutados, e em casos, mesmo não testados, com risco primário de alterações nos mesmos genes (Salem *et al.*, 2013).

Em aspectos complementares, o valor de diagnóstico da RM é usado principalmente para a) detecção multifocal, multicêntrica e de patologia contralateral, ou quando a detecção por MA e US não foi suficiente para reconhecer a anormalidade mamária; b) detectar a possibilidade de invasão tumoral em CDIS; c) avaliar a resposta à quimioterapia neoadjuvante; d) detectar massas tumorais ocultas na mama, principalmente quando presentes inicialmente nos linfonodos axilares; e) detecção de lesões impalpáveis em mamas densas (Menezes *et al.*, 2014).

Considerando a capacidade de detecção de lesões ocultas na mama, Schelfout *et al.*, (2004) demonstrou que a RM foi capaz de revelar 96% das patologias mamárias multifocais/multicêntricas, enquanto a MA e a US, comparadamente, foram capazes de detecção de somente 28,6% e 26,5%, respectivamente.

Dessa forma, o uso do contraste paramagnético no estudo por RM das mamas mostrou-se importante na detecção de corpos não realçados nos demais exames por imagem. Em conclusão, a RM permitiu revelar informações quanto à natureza e aos estágios da doença (Leopoldino *et al.*, 2005).

Classificação BI RADS

O relatório de imagem da mama e do sistema de dados (BIRADS – *Breast Imaging Reporting and Data System*) foi instituído pelo ACR em 1998 para lidar com a falta de padronização e uniformidade na mamografia (Tabela 1). Em 2003 foi feita a reformulação final da classificação BI RADS (ACR, 2003) sendo então, adotada universalmente para os três exames de imagens utilizados na clínica. Com a implantação do sistema, a interpretação dos achados ultrassonográficos passou a definir apropriadamente as lesões de ecogenicidade complexa, os cistos complicados, a orientação da lesão, o halo ecogênico e a presença de achados associados (Burnside *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Categoria BI RADS

Categoria	Interpretação	Probabilidade (%)	Conduta
0	Inconclusivo		Exame adicional
1	Benigno	0	Controle anual a partir dos 40 anos
2	Benigno	0	Controle anual a partir dos 40anos
3	Provavelmente benigno	<2	Controle semestral
4 (A,B,C)	Suspeito	>2 a >90	Biópsia
5	Provavelmente maligno	>95	Biópsia
6	Lesão maligna (biopsiada ou diagnosticada), não submetida à terapia definitiva	100	

Fonte: Quadros, 2003

Embora, a imagem seja considerada padrão ouro para triagem inicial do câncer de mama, o diagnóstico das lesões impalpáveis (infraclinicas) apresentam-se como uma particularidade para o diagnóstico. Esta lesão pode passar despercebida por ser muito pequena (infracentimétrica), por sua localização ser de difícil acesso à palpação (prolongamento axilar ou porção profunda da mama, por exemplo), por tratar-se de mama volumosa muito densa, mama pós-cirurgia reparadora ou, ainda, de mama com intenso processo de alterações fibrocística. Ainda, por ser de difícil contraste, estas lesões, frequentemente, são interpretadas e classificadas na categoria BI RADS de forma errada. Por exemplo, classificações BI RADS 4 podem ser consideradas lesões benignas, ou malignas, levando a biópsia mamária, que em grande maioria, torna-se desnecessária.

Marcadores de imunoistoquímica para o câncer de mama

A marcação dos fragmentos mamários por HE no laudo histopatológico é considerado padrão ouro na detecção de anormalidades mamárias e do processo carcinogênico. A imunoistoquímica tomou espaço dentre os procedimentos complementares de microscopia patológica e os marcadores de RE, RP e HER-2 atualmente são utilizados como valores de prognóstico, sendo fundamentais na decisão do tratamento do câncer de mama (Jorns *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Antes disso, os primeiros relatos da detecção destes receptores hormonais datam do início de 1960, e desde então tem sido comprovada a dependência destes receptores na patologia mamária (Jensen *et al.*, 1967). Mais adiante, outros marcadores passaram a serem utilizados adjuvamente para a determinação de um diagnóstico mais preciso, tais como marcadores de células mioepiteliais para diferenciação de formações celulares *in situ*, ou invasivas, por exemplo, as citoqueratinas, CK5/6, CK14, CK19 and CK903 (Zhao *et al.*, 2014).

Receptores esteroídicos

Estrogênio e Progesterona

Os estrogênios são produzidos nos ovários e na placenta, e em menores quantidades no tecido adiposo, testículos, vasos sanguíneos, mama e outros. No total existem três compostos: o estradiol, o estrona e o estriol, sendo o estradiol o mais potente e o de maior produção nos ovários (Czajka-Oraniec & Simpson, 2010). O receptor de estrogênio é dividido em dois subtipos, RE- α e RE- β , sendo que ambos compartilham de estruturas funcionais similares. O receptor RE- α possui 595 aminoácidos com um domínio central de ligação ao DNA e uma longa cadeia carboxi-terminal de ligação do hormônio (Czajka-Oraniec & Simpson, 2010).

O estrogênio é um fator necessário para crescimento normal e desenvolvimento do tecido mamário, mas altos níveis deste composto eleva o risco do desenvolvimento para o câncer de mama (Caldon, 2014). Isto se explica por três motivos a) o receptor ER- α se transloca para o núcleo promovendo o controle da expressão gênica; b) produtos oxidativos gerados a partir do metabolismo do estrogênio promovem quebras e danos ao DNA e; c) exposição excessiva do estrogênio leva a um crescimento desregulado das células expostas a estes receptores (Caldon, 2014).

Os receptores de progesterona se assemelham bastante com os de estrogênio, possuindo duas isoformas, o RP- α e RP- β . Ambos possuem a região de extremidade C-terminal e o sítio de ligação ao DNA. Uma vez, sob influência do hormônio progesterona, a porção de ligação se transloca sentido nuclear promovendo a regulação da expressão de genes alvos (Folgueira & Brentani, 2010).

Em geral, os receptores de estrógeno e progesterona são fatores preditivos de resposta à hormonioterapia. A positividade dos receptores depende da idade e período menstrual da mulher, sendo que em média, 30% apresentam RE+. Esta porcentagem é reduzida em 10-20% nas mulheres em período de pré-menopausa e se eleva a 50-60% nas mulheres em período de pós-menopausa. O valor prognóstico dos receptores de estrogênio é diversificado entre os estudos, porém é relatado que pacientes com RE+ apresentam tempo de sobrevida livre da doença maior que pacientes RE-. Desta forma, tem-se sugerido que o RE esteja mais associado ao crescimento celular do tumor, do que propriamente um marcador de potencial

metastático (Dieci *et al.*, 2014; Dunnwald *et al.*, 2007; Abdel-Fatah *et al.*, 2007; Ottesen *et al.*, 2000).

Várias modalidades de hormoniterapia já foram utilizadas no tratamento do câncer de mama, utilizando em especial anti-progestágenos. Atualmente o usual é utilizar de moduladores seletivos para receptores de estrógeno, como tamoxifeno, inibidores de aromatase e análogos de hormônio da gonatropina, justamente pela seletividade e participação protagonista no câncer de mama (Folgueira & Brentani, 2010). É regulamentado que se faça a pesquisa de expressão dos receptores hormonais em todos os tipos de tumores mamários, inclusive em CDIS (Allred *et al.*, 2010). A hormoniterapia é indicada para qualquer paciente que apresente expressão dos receptores esteroídicos de forma adjuvante, ou mesmo, de forma paliativa em tumores em processo metastático. Além destes, alguns estudos sugerem o uso de tamoxifeno em mulheres normais com risco para câncer de mama podendo reduzir a incidência da doença (Chlebowski *et al.*, 2002).

Fator de crescimento epidérmico humano tipo-2 (HER2)

Os estudos que detalham a identificação do gene codificador de HER2 tiveram início em 1985 (Yang-Feng *et al.*, 1985). Com características similares aos genes da família de crescimento epidérmico, o gene foi isolado a partir de células tumorais do sistema nervoso central e, então, denominado de NEU. Em 1988, Van de Vijver *et al.*, (1988) deu os primeiros passos na identificação da influência do gene no câncer de mama. No subtipo comedo, o estudo observou uma forte marcação da proteína HER2 no tecido em crescimento, porém não foi possível encontrar associações entre o status do linfonodo e a recorrência do tumor com a expressa marcação.

O gene codifica uma proteína de 185 kDa de localização transmembrana dependente da atividade da tirosina quinase responsável pela emissão da sinalização de crescimento celular. Em consequência, tumores mamários que expressam HER2 são mais agressivos e apresentam uma sobrevida livre da doença e global com taxas inferiores aos que não expressam (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989; Winstanley *et al.*, 1991).

Acredita-se que cerca de 15-20% dos tumores mamários são HER2+ e respondem ao Trastuzumabe como primeira linha de tratamento. Em 2005, a liberação do Trastuzumabe foi

uma evolução e esperança no tratamento dos cânceres HER2+, pois age sob a porção extracelular da proteína e inibe a progressão do tumor (Romond *et al.*, 2005).

Embora as ferramentas para o diagnóstico de tumores HER2 tenham aumentado, após 10 anos de tratamento por Trastuzumabe, ainda são constantes as mudanças na clínica para se dizer qual tumor seria propriamente positivo. A heterogeneidade do tumor traz discordâncias quanto a sua marcação e nem sempre a primeira linha do tratamento promove a sensibilidade dos receptores hormonais.

Classificação molecular do câncer de mama

A classificação do câncer de mama tem avançado significativamente com a validade das técnicas genômicas. A partir da década passada ficou definida a classificação molecular em quatro grupos: luminal (A e B), basal-like, superexpressão de HER2 e normal *breast-like*, cada um associado com fatores moleculares específicos (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001; Sørlie *et al.*, 2006).

Os tumores luminais apresentam receptores ER+, padrões de expressão gênica das células epiteliais luminais mamárias, incluindo a expressão das citoqueratinas tipo 8 e 18 (Parker *et al.*, 2009; Weigelt *et al.*, 2010), além de possuírem fenótipo de baixa proliferação celular, expressão elevada de genes relacionados ao ER e bom prognóstico (Sørlie *et al.*, 2006). Já os tumores luminais tipo B apresentam altas taxas de proliferação, tipo histológico agressivo e apresentam prognóstico pior que os luminais A (Sorlie *et al.*, 2006).

O subtipo basal, também conhecido como triplo negativo, apresenta RE-, RP- e HER2-. Possuem comportamento agressivo, de pior prognóstico e alvo terapêutico não definido (Mersin *et al.*, 2008). Constituem cerca de 10-20% de todos os tumores de mama afetando mais frequentemente mulheres jovens. Não respondem a tratamentos com drogas antiestrogênicas e monoclonais, além de apresentarem fenótipo quimiorresistente. Novos dados tem enfatizado que a complexidade molecular do câncer de mama triplo-negativo constitui muito mais do que um modelo basal. A análise transcriptoma de tumores triplo-negativos identificaram seis subtipos, sendo dois tipos basais, um imunomodulatório, um mesenquimal, um mesenquimal do tipo células-tronco, e um subtipo luminal receptor de andrógeno (Lehmann *et al.*, 2011).

O subtipo superexpressão do HER2, cujo fenótipo é RE- e HER2+, apresentam uma 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 respondem a drogas que bloqueiam a atividade de HER2, por exemplo, o anticopo monoclonal Trastuzumabe®.

O subtipo *normal breast-like* foi caracterizado por meio do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células epiteliais (Peppercorn *et al.*, 2008). Este subtipo está pobremente caracterizado e a sua significância clínica ainda é limitada.

Biomarcadores e marcadores circulantes na carcinogênese mamária

A avaliação dos indicadores preditivos e prognósticos de pacientes com câncer de mama é uma prática na oncologia clínica. Apesar das melhorias advindas da tecnologia e o uso da mamografia tenha se tornado recorrente para o rastreamento, ainda são diversas as limitações para o diagnóstico seguro, além das elevadas taxas de mortalidade no mundo (Balabram *et al.*, 2013).

Com o avanço das técnicas genômicas, novos biomarcadores tem sido propostos, em resposta, principalmente à descoberta e elucidação de alterações moleculares que são responsáveis pela iniciação e progressão dos cânceres em humanos (Yates & Campbell, 2012; Mardis *et al.*, 2012). Porém, mesmo com tantas descobertas, a dificuldade em encontrar marcadores genômicos específicos tem sido notado em um número exorbitante de estudos, caso-controle, porém com poucos resultados de associações significativas (Easton *et al.*, 2007).

A busca por marcadores presentes no sangue, ou em outros fluidos biológicos, vem sendo amplamente pesquisados como forma de aperfeiçoar a detecção e permitir com que o tratamento se torne mais eficaz. Com isso, a biologia molecular tem contribuído para um maior avanço no conhecimento sobre os mecanismos que regulam a proliferação e a diferenciação celular na carcinogênese.

Sabe-se que a neoplasia é resultado de uma gama de modificações genômicas, que podem ser alterações herdadas ou adquiridas. Estas modificações moleculares possibilitaram dar início a um amplo espectro de descobertas de biomarcadores. As principais anormalidades

genéticas observadas incluíram a expressão aumentada de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase e alterações epigenéticas (Filho *et al.*, 2009). Dessa forma, ao longo dos anos, muitas destas alterações foram desvendadas e marcadores pontuais puderam ser aplicados na rotina clínica.

Particularmente, o câncer de mama apresenta histopatologia, variações genéticas e moleculares que podem resultar em diferentes respostas clínicas (Vargo-Gogola & Rosen, 2007). Desde o desenvolvimento dos microarranjos genéticos tem-se destacado os principais genes envolvidos no câncer de mama. Destes estudos foram destacados alguns marcadores genéticos de supressão tumoral, crescimento epidermal, recorrência e metástase (Paik *et al.*, 2004; Paik *et al.*, 2006). Vale ressaltar que estes testes colaboram com a decisão terapêutica, e em muitos casos são responsáveis por eliminar procedimentos agressivos como a quimioterapia. Porém, nem sempre apresentam compatibilidades quando testados em conjunto e possuem margens intermediárias que surtem dúvidas que comprometem a sua confiabilidade e interpretação. Mesmo sendo de bastante valia, demais alterações devem ser avaliadas de forma mais detalhada, pois mutações e alterações epigenéticas nos genes supressores tumorais são frequentes no tumor mamário.

O DNA do tecido tumoral continua e representa o principal alvo de pesquisa para caracterização e fenótipo tumoral, porém depende de técnicas invasivas para sua obtenção. Nos últimos anos a possibilidade de detecção de alterações mínimas no DNA advindo de outros fluidos, principalmente do sangue periférico, têm dado início a novas possibilidades com correlações sistêmicas. Dentre estas possibilidades estão às alterações epigenéticas que podem estar frequentes não somente nas regiões promotoras dos genes, mas como também nas sequências repetitivas e intragênicas do DNA. As mudanças epigenéticas são em grande parte acumulativas e resultantes dos fatores de exposição durante a vida, que incluem a idade (Teschendorff *et al.*, 2010; Rakyan *et al.*, 2010), hormônios (Li *et al.*, 2003), radiação (Ma *et al.*, 2010), álcool (Christensen *et al.*, 2010), fumo (Vineis *et al.*, 2011) e partículas em suspensão no ambiente (Baccarelli *et al.*, 2009). Flanagan *et al.*, (2009) reafirma que estas alterações podem ser herdadas, ou adquiridas e podem ser detectadas não somente nos tecidos, mas também no DNA advindo dos linfócitos do sangue periférico.

Os trabalhos que utilizaram da saliva como fonte de pesquisa para análise de risco para câncer de mama, detectaram proteínas e mRNAs diferencialmente expressos em casos tumorais comparados aos grupos controles (Zhang *et al.*, 2010). Abraham *et al.*, (2012) destacam as potenciais vantagens da coleta de amostras de saliva em comparação com a

coleta de amostra de sangue. Apresentam menor custo, menor risco de infecção e/ou acidentes biológicos, aumento de aceitação e conveniência do paciente. No entanto, as desvantagens de seu uso estão envolvidas principalmente na quantidade do material obtido, assim como possível contaminação com o DNA bacteriano.

Em conclusão, a investigação das alterações comuns ao tecido mamário, pode ser aplicada ao DNA salivar, desde que existam procedimentos adequados de coleta e extração, além de plataformas de última geração para sua devida análise.

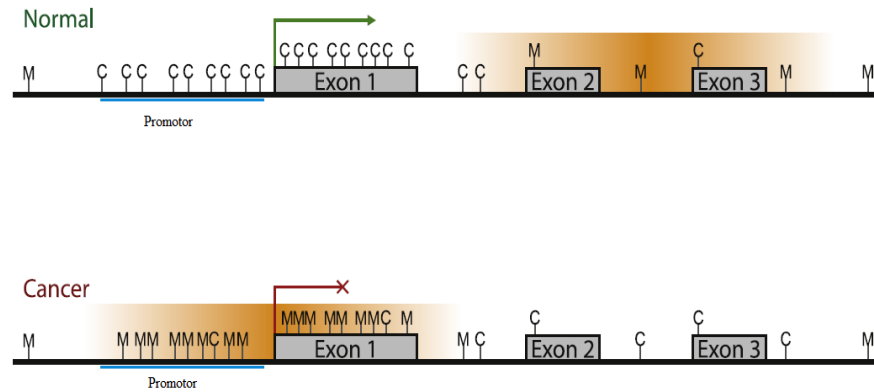
Epigenética no câncer de mama

A epigenética envolve três eventos moleculares, que incluem: a metilação do DNA, as modificações nas histonas e a remodelação da cromatina (Lo & Sukumar, 2008). As alterações determinadas pela metilação do DNA são modificações químicas, classificadas em hipometilações e hipermetilações, sendo estas comuns aos dinucleotídeos CpG (Hinshelwood & Clark, 2008).

A metilação do DNA acontece pela ação das enzimas DNMTs, que acrescentam o grupo metil ao quinto carbono do anel pirimidínico. Cerca de 75% destas regiões são metiladas em algum momento do genoma dos mamíferos e se localizam preferencialmente em regiões promotoras de regulação dos genes (Antequera & Bird, 1999; Javanovic *et al.*, 2010).

As ilhas CpG são trechos curtos do DNA, em média com 200 pb e vários Kb de comprimento. Apesar da tendência comum para metilação destas ilhas, em especial, na célula normal isto não acontece, permitindo a transcrição gênica. Já nas células tumorais estas ilhas estão metiladas, acarretando no silenciamento gênico (Figura 4). A metilação envolve uma série de genes relacionados à supressão tumoral e aqueles envolvidos com as vias de reparo (Lo & Sukumar, 2008; Javanovic *et al.*, 2010).

Figura 4 - Mecanismo de metilação em célula normal e carcinogênica



Legenda: O DNA da célula normal apresenta região promotora em estado não metilado, permitindo a transcrição do gene. A metilação neste caso é mais comum em regiões intergênicas. Na célula em estado de carcinogênese acontece o inverso. A região promotora é metilada desativando a transcrição do gene

Fonte: Javanovic *et al.*, 2010.

A metilação no tecido mamário está relacionada, em partes, pelos fatores de risco à carcinogênese. A idade avançada, por exemplo, permite o acúmulo de mutações somáticas, que acarretam na disfunção da telomerase permitindo o silenciamento gênico de várias regiões promotoras. Exposições a níveis aumentados de estrogênio favorecem o crescimento celular do epitélio mamário, o que leva consequentemente a modificações epigenéticas no DNA (Widschwendter & Jones, 2002).

Dentre os genes que sofrem hipermetilações no tecido mamário incluem: os de crescimento, envolvidos na invasão e apoptose (*DAPK*, *TWIST1* e *HOXA5*), regulação no ciclo celular (*CDKN2A* e *CCND2*), invasão celular e metástase (*CDH1* e *APC*), reparo do DNA (*BRCA1* e *GSTP1*) e sinalização celular (*ER* e *RARb2*) (Widschwendter & Jones, 2002; Li *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2013).

Os genes supressores tumorais na carcinogênese mamária

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada por apoptose. As alterações genéticas que inativam estes genes permitem que estas células fujam do controle de checagem e promovam a sua proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (Weinberg, 1991).

O câncer de mama revela frequentes alterações genéticas em genes supressores tumorais que controlam o ciclo celular, porém é pouco conhecido os eventos iniciais que acontecem durante a carcinogênese mamária *in vivo*, justamente pela dificuldade de sua detecção precoce (Zhang *et al.*, 2006).

Dentre os diversos genes, talvez o mais estudado, o gene supressor tumoral *TP53/p53* que controla o ciclo celular, promove o reparo de DNA, induz e controla o fluxo de senescência e apoptose, além de exercer papel no metabolismo celular tem se verificado a sua inativação, em destaque, nos carcinomas infiltrativos e *in situ* de alto grau (Done *et al.*, 2001; Brosh & Rotter, 2009).

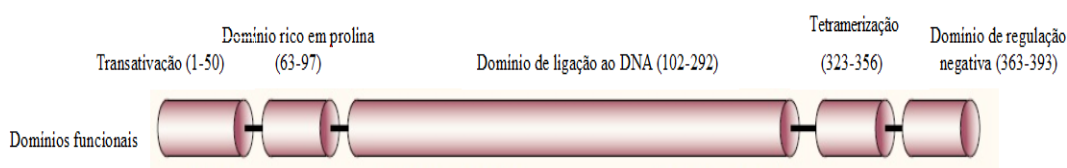
O gene supressor tumoral *CDKN2A/p16^{INK4A}* associado ao seu transcrito alternativo *p14^{ARF}* tem sido descrito com poucas alterações somáticas e germinativas em tumores mamários, porém aparecem inativados com frequências elevadas principalmente pela metilação das regiões promotoras *p16^{INK4A}* e *p14^{ARF}* (Holst *et al.*, 2003; Tlsty *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

Outro gene, o *ATM*, com papel funcional, em destaque para o controle da via de reparo de quebra dupla do DNA, tem sido pesquisado justamente por determinar aos indivíduos que carregam a sua homozigosidade, risco aumentado para desenvolvimento do câncer de mama (Angele & Hall, 2000). A alta frequência com que ocorrem as alterações nestes genes no câncer de mama os torna potenciais marcadores da carcinogênese.

Gene supressor tumoral *TP53* (p53) (OMIM–191170)

TP53 é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína de 53-kd, a p53, estando localizado na região 17p13. Descoberta em 1979, a proteína p53 foi detectada juntamente a proteína transformante do vírus SV40, T-Ag (Lane e Crawford, 1979). Contém 11 exons e pertence à família dos genes altamente conservados com outros dois membros, *P63* e *TP63* (Yang *et al.*, 1998). A proteína codificada contém 393 aminoácidos e cinco domínios estruturais e funcionais: um domínio de transativação do N-terminal, um domínio regulatório rico em prolina, um domínio de ligação ao DNA sequência-específico, um domínio de oligomerização e um domínio C-terminal envolvido na regulação do DNA (Bouchet *et al.*, 2006) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura de domínios funcionais da proteína p53

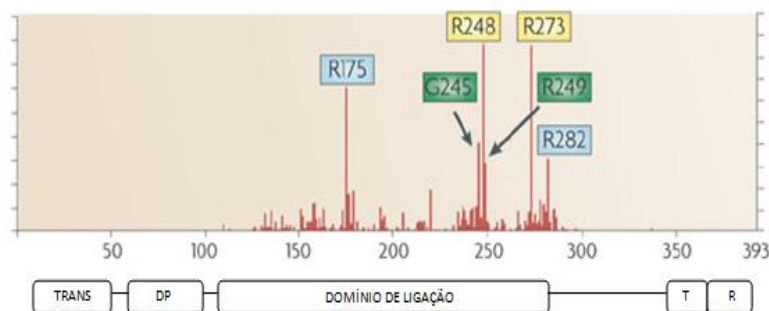


Fonte: Adaptado de Soussi & Bérout, 2001

As alterações em *TP53* incluem perda de alelos, mutações genéticas (maioria do tipo perda de sentido “missense”) e inativação da proteína por sequestro de proteínas virais. As frequências globais de mutação neste gene vão de 5% a 50% dependendo do tipo do tumor e estágio. Dentre os tumores com altas taxas de mutações (45-50%) incluem ovário, esôfago, coloretal, cabeça, pescoço e neoplasias pulmonares; e tumores cerebrais, mama, estômago e fígado apresentam frequência intermediária de mutações (20-35%) (IARC, 2012).

As mutações somáticas no gene acontecem em maioria na porção de domínio central do gene e 30% das mutações totais afetam os códons denominados “hotspots” (175, 245, 248, 249, 273 e 282) (Figura 6). Estas mutações afetam principalmente cinco citosinas localizadas nas ilhas CpG do gene, e por estarem justamente na porção de contato da proteína-DNA (248 e 273) ou na conformação da proteína (175, 245, 249 e 282) não irão permitir à p53 reconhecer seus genes alvos.

Figura 6 - Regiões de “hotspots” no gene *TP53*



Legenda: Trans – Domínio de transativação; DP – domínio rico em prolina; T – tetramerização; R – domínio de regulação

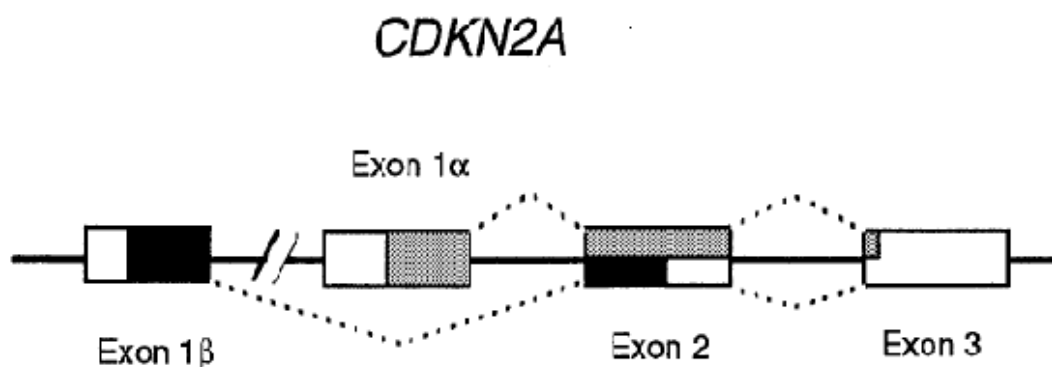
Fonte: Modificado de Brosh & Rotter, 2009

No câncer de mama as alterações descritas correspondem a menos de 10% nas hiperplasias ductais atípicas e mais frequentes nos carcinomas *in situ* e cânceres invasivos (Eisenberg & Koifman, 2001). A mutação em *TP53* pode ser um evento inicial em CDIS, contudo há estudos que sugerem o CDIS como precursor da doença invasiva (Eisenberg & Koifman, 2001).

Gene supressor tumoral *CDKN2A* (OMIM–600160)

Conhecido por nomes alternativos: *CDKN2*; *CDK4 INHIBITOR*; *MULTIPLE TUMOR SUPPRESSOR 1/MTS1*; *TP16*; *p16*; *p16^(INK4)*; e *p16^(INKA)*; o gene *CDKN2A* é determinado como supressor tumoral, devido à prevalência de inativação genética em praticamente todos os tipos de cânceres humanos (Li *et al.*, 2011). As primeiras mutações germinativas no gene datam de 1995, em melanomas hereditários (Walker *et al.*, 1995).

Identificado em 1994 com localização na banda cromossômica 9p21, por meio da análise de linhagens de células de melanoma, corresponde a uma região gênica com menos de 40 kb e é responsável por codificar duas diferentes proteínas (p14 e p16), a partir de três exons. O primeiro exon (E1 - 1 α) possui 125 pares de bases, E2 com 307 pares de bases, e E3 com apenas 12 pares de bases (Kamb *et al.*, 1994) (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura do gene *CDKN2A*

Fonte: Stott *et al.*, 1988

Ambas as proteínas p16 e p14 agem como supressoras tumorais, atuando na regulação do ciclo celular. A principal função da proteína p16 é se ligar a ciclina dependente de quinase 4 (CDK4), de modo que iniba a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), contudo, restringindo a liberação do fator E2F na fase G1. Dessa forma, a progressão para a fase S é interrompida (Kamb *et al.*, 1994).

Considerando que a proteína p16 funcione via supressão tumoral do gene *RB*, a proteína p14 está diretamente envolvida na regulação da supressão tumoral, via p53 e apoptose celular. A p14 se liga a proteína MDM2 (responsável pela regulação dos níveis celulares da proteína p53), promovendo a sua rápida degradação. Com isso, a modificação e/ou degradação de MDM2, promove a estabilização e acúmulo de p53 (Kamb *et al.*, 1994).

A inativação de *CDKN2A* foi descrita em melanomas (Amos *et al.*, 2012; Kamb *et al.*, 1994), em carcinomas pancreáticos (Harinck *et al.*, 2012), carcinomas esofágicos (Qureshi *et al.*, 2012), leucemias agudas (Iacobucci *et al.*, 2011) e outros (Huillard *et al.*, 2012). Dessa forma, fica evidente que as alterações na região 9p21 são capazes de aumentar a probabilidade de transformação celular, a ponto de encaminhar a célula à transformação maligna.

No câncer de mama as alterações moleculares no gene *CDKN2A* correspondem principalmente a fatores epigenéticos, contudo hipermetilações nas regiões promotoras do gene estão envolvidas na invasão e metástase (Barekati *et al.*, 2012, Tao *et al.*, 2011). Alguns trabalhos recentes têm demonstrado que a perda de expressão de *CDKN2A* está envolvida principalmente as características do câncer de mama triplo negativo (Arima *et al.*, 2012; Bohn *et al.*, 2010).

Gene supressor tumoral *ATM* (OMIM–607585)

O gene *ATM* foi mapeado no cromossomo 11q22-23 em 1988 (Gatti *et al.*, 1988) e clonado em 1995 (Savitsky *et al.*, 1995). Ocupa um espaço de 150 Kb dentro o genoma com 66 exons. O seu transcrito possui cerca de 13 Kb com uma sequência de codificação de 9168 pb. Dentre a sua extensão existem transcritos alternativos e sua proteína codificada possui 350 kDa (Savitsky *et al.*, 1995).

Dentre suas funções, o gene atua como iniciador do mecanismo de reparo de quebra dupla do DNA. Neste mecanismo de sinalização há uma série de fosforilações que tornam o complexo formado ativo e, em resultado, mecanismos de indução da apoptose e/ou reparo são iniciados (Bakkenist *et al.*, 2003).

Mutações hereditárias no gene *ATM* são a causa da instabilidade rara do genoma que é denominada síndrome da Ataxia Telangiectasia (A-T). Caracterizada pela autossomia recessiva do gene, estes casos possuem taxas de até 40% de risco para o desenvolvimento de leucemias e linfomas primários, justamente pela deficiência em reparo genético no sistema imunológico (Morrel *et al.*, 1986). Embora, não existam muitos estudos que comprovem a influência da heterozigidade no risco para desenvolvimento de câncer de mama, Swift *et al.*, (1991) demonstraram que carregar o alelo recessivo pode aumentar em cerca de 5 vezes o risco para o seu desenvolvimento.

Dentre os estudos mais recentes, polimorfismos e metilações nas regiões promotoras são destaque, justamente pela complexidade e tamanho da região codificante do gene (Stredrick *et al.*, 2006). Vo *et al.*, (2004) demonstraram a redução de expressão da proteína em resultado da metilação da região promotora em cânceres de mama esporádicos e, em demais trabalhos, foi relatada sua redução de expressão em pacientes com uma menor sobrevida livre da doença (Ye *et al.*, 2007) e em tumores triplo-negativos (Tommiska *et al.*, 2008).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar a presença de marcadores circulantes em mulheres com alterações mamárias BI RADS 3 e 4.

1.2 Objetivos específicos

- a) Detectar mutações somáticas nos genes *TP53* (exons 4-9) e *CDKN2A* (exon 1-3) em lesões impalpáveis da mama por sequenciamento direto;
- b) Avaliar o perfil epigenético dos promotores dos genes *CDKN2A* (*p14^{ARF}* e *p16^{INK4a}*) e *ATM* em DNA de lesões mamárias, sangue e saliva de mulheres com lesões mamárias BI RADS 3 e 4.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 População de estudo

Foram incluídas 62 pacientes do sexo feminino com mamografia e ultrassonografia determinada em BI-RADS 3 e 4, com lesões impalpáveis, antes do período de tratamento. As pacientes são provenientes do Instituto Nacional de Câncer, unidade III (HCIII/INCA) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), ambos localizados no município do Rio de Janeiro.

Previamente para obtenção das amostras, as pacientes selecionadas foram informadas sobre os objetivos do projeto e os seus direitos da participação através de entrevista pessoal. Após a garantia da participação voluntária foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e um questionário pessoal, para obtenção dos dados clínicos (Anexo A). O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais HCIII/INCA (109/07) (Anexo B) e HUGG (07/2007 - 80/2012) (Anexo C).

2.2 Obtenção de amostras

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

As amostras de tecido mamário (1-10 cm) foram coletadas e lavadas com soro fisiológico (0,9%) para remoção do excesso de sangue. Os fragmentos do tecido foram colocadas em 500 µL de tampão de lise (NaCl 100 mM; Tris 10mM pH 8,0, EDTA 25 mM, SDS 0,5%, proteinase K 100 µg/mL (Invitrogen®) e mantidas sob refrigeração até o momento de extração do material genômico.

As amostras de sangue (4 mL) foram coletadas em tubo *vacutainer* com EDTA e armazenadas em temperatura ambiente, até a extração do material genômico.

2.3 Extração do material genômico (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

2.3.1 Tecido tumoral

Os fragmentos das biópsias foram extraídos a partir do método “fenol-clorofórmio”. As amostras teciduais imersas em solução de digestão (NaCl 100 mM; Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 25 mM, SDS 0,5%, proteinase K 100 µg/mL - Invitrogen™) foram maceradas com auxílio de um pistão plástico e homogeneizadas a uma adição de 10 µL de proteinase K (20 mg/µL - Invitrogen™).

Os tubos foram incubados por 12 horas à 56°C e em seguida centrifugados a 14.000 g por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 1,5 mL e homogeneizados a uma mistura de fenol SIGMA® (Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamílico na proporção 25:24:1, saturado com 10mM de TRIS, pH 8.0 e 1 mM de EDTA) em quantidade (volume) igual a amostra digerida no tubo. Os tubos foram centrifugados a 14.000 g por 5 minutos. Três fases foram observadas, sendo a fase aquosa (superior) transferida para um microtubo de 1,5 mL. Neste momento, adicionou-se acetato de amônio 8 M e etanol 100% nas quantidades de 0,1X e 2X, respectivamente, referente ao volume da amostra. A mistura foi incubada a -20° C por um período de 16 horas.

No término da incubação foi realizada uma centrifugação a 14.000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 100 µL de água ultra-pura.

2.3.2 Sangue

Uma amostra de 4 mL de sangue (armazenados em tubo com anti-coagulante EDTA) foi transferida para um tubo de 15 mL e centrifugada a temperatura ambiente por 10 minutos a 2.000 g. O sobrenadante (plasma) foi desprezado e ao restante foram adicionados 10 mL de solução de lise de hemácias (10 mM TRIS-HCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) gelada (4°C).

O tubo foi agitado vigorosamente e mantido em gelo durante 30 minutos. Depois, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as etapas descritas anteriormente foram repetidas até que o precipitado se apresentasse esbranquiçado.

O concentrado, quando adequado, foi ressuscitado em 600 µL de solução de lise de núcleos (10 mM TRIS, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl), mais 15 µL de SDS 20% (c.f 50 µg/mL), 1,5 µL de proteinase K (c.f 50 µg/mL - Invitrogen™) e mantido a 37°C durante a noite.

No dia seguinte foi adicionado o mesmo volume da amostra em mistura de fenol SIGMA® (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamil na proporção 25:24:1, saturado com 10 mM TRIS, pH 8,0, 1 mM EDTA) e centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 3000 g. A fase de cima que contém o DNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL.

O DNA foi precipitado adicionando 0,1X o volume com acetato de amônio 8 M mais 2X o volume com etanol 100% e incubado a -20°C por 16 horas. Depois, o tubo foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água ultra-pura.

2.3.3 Saliva (Gonçalves *et al.*, 2010)

Aproximadamente 1 mL de saliva foi coletado e levado à centrifugação a 14.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e homogeneizado com 2 µL de EDTA a 0,5M e 1 µL/mL de PMSF 0,1 mg/mL). O tubo foi agitado e armazenado no congelador a -80°C.

O concentrado da saliva foi ressuscitado em 600 µL de solução de lise de núcleos (10 mM TRIS, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl), mais 15 µL de SDS 20% (c.f 50 µg/mL), 1,5 µL de proteinase K (c.f 50 µg/mL - Invitrogen™) e mantido a 37°C durante a noite.

No dia seguinte foi adicionado o mesmo volume da amostra em mistura de fenol SIGMA® (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamil na proporção 25:24:1, saturado com 10 mM TRIS, pH 8,0, 1 mM EDTA) e centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 3000 g. A fase de cima que contém o DNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL.

O DNA foi precipitado adicionando 0,1 X o volume com acetato de amônio 8 M mais 2 X o volume com etanol 100% e incubado a -20°C durante a noite. Depois, o tubo foi

centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 50 µL de água ultra-pura.

2.4 Eletroforese do DNA genômico (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

Após a extração, a presença e a integridade do DNA foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/µl - InvitrogenTM). A corrida eletroforética foi realizada com o tampão TAE 1X a 100 V durante 45 minutos. Foi aplicado no gel uma mistura de 2 µL de DNA e 5 µL de tampão de carregamento 1 X (50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol). Após a corrida, o gel foi fotografado e arquivado com a sua devida identificação.

2.5 Investigação mutacional no gene supressor tumoral *TP53*

2.5.1 Reação em cadeia pela polimerase do gene *TP53*

Para amplificar os exons 4 ao 9 foram utilizadas na solução base: 35 µL de água ultra-pura e estéril, 5 µL de tampão STR 10X (InvitrogenTM); 2 µL de dNTPs (10 mM) (InvitrogenTM), 3 µL de MgCl₂ (50 mM) (InvitrogenTM), 3 µL do par de iniciadores para cada região a ser amplificada, (Tabela 2) concentrados a 10 pmol/µL, 0,5 µL da enzima DNA polimerase (1 U/µL) (InvitrogenTM) e 50- 100 ng/µL de DNA genômico. Sendo o volume final de 50 µL.

Os iniciadores foram desenhados a partir da ferramenta do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Primer-BLAST, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), com base na referência de acesso NC_000017-9 do GenBank utilizada pelo IARC.

No termociclador *PTC-100TM Programable Thermal Controller*, a amplificação dos exons 5 ao 7 e 9 foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 2 minutos a 94°C,

seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

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

A amplificação do exon 4 foi feita uma pré-desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos iniciadores a 55°C por 45 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 45 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores do gene *TP53*

Exon <i>TP53</i>	Denominação e sequência dos iniciadores	Tamanho do Amplicon (pb)
4	4F – TGAGGACCTGGTCCTCTGAC 4R - TGAAC TTTGGGATTCCTCT	413
5	5F - TGTTCACTTGTGCCCTGACT 5R – AGCAATCAGTGAGGAATCAG	310
6	6F - TGGTTGCC CAGGGTCCCCAG 6R – CGGAGGGCCACTGACAACCA	224
7	7F – CTTGCCACAGGTCTCCCCAA 7R – AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	237
8	8F – TTGGGAGTAGATGGAGCCCT 8R – AGAGGCAAGGAAAGGTGATA	337
9	9F – CCAAGGGTGCAGTTATGCCT 9R - AAAGTTTCCAGTCTCAATCA	186

Legenda: F- “*forward*” = senso; R- “*reverse*” = anti-senso

2.6 Investigação mutacional no gene supressor tumoral *CDKN2A*

2.6.1 Reação em cadeia pela polimerase do gene *CDKN2A*

Para amplificar os exons 1, 2 e 3 foram utilizadas na solução base: 33 - 32,5 μL de água ultra-pura e estéril; 5 μL de tampão STR 10X (Invitrogen™); 2 μL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen™); 3 μL de MgCl_2 (50 mM) (Invitrogen™); 3,5 μL do par dos iniciadores para cada região a ser amplificada, (Tabela 3) concentrados a 10 pmol/ μL ; DMSO: 5% (para exon 1), 4% (para os exons 2 e 3); 0,5 μL da enzima DNA polimerase (1 U/ μL) (Invitrogen™) e 1 μL de 100-200 ng/ μL de DNA genômico, sendo o volume final de 50 μL .

No termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller*, a amplificação dos exos 1 e 3 foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 10 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 55°C por 45 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 45 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 7 minutos.

Para a amplificação do exon 2 foram utilizadas a mesma reação e ciclagem, tendo por única diferença a temperatura de anelamento que passou a ser 58°C.

Tabela 3 - Sequências dos iniciadores do gene *CDKN2A*

<i>CDKN2A</i> exon	Denominação e sequência dos iniciadores	Tamanho do amplicon (pb)
1α	1 α F - ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG 1 α R – AGAATCGAAGCGCTACCTGA	356
2	2F - GTGAGGGGGCTCTACACAAG 2R – GGGCTGAACTTTCTGTGCTG	470
3	3F – TACATGCACGTGAAGCCATT 3R – CATTACGGTAGTGGGGAAA	339

Legenda: F- “forward” = senso; R- “reverse” = anti-senso

Fonte: Robertson *et al.*, 2010

2.7 Eletroforese em gel de agarose 1,5% (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

Para a verificação da eficiência da reação da PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X e corados com brometo de etídeo (0,5 µg/µL – Invitrogen™). Foram aplicados 5,0 µL do material amplificado juntamente com 5 µL de tampão de carregamento 1X (50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol). Utilizou-se, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 50 pares de base (Invitrogen™). A eletroforese foi realizada a 100 V por 45 min e o gel foi fotografado com sua devida identificação.

2.8 Purificação do produto de amplificação dos genes *TP53* e *CDKN2A*

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

Foram adicionados 500 µL de tampão de captura junto à mistura do produto de PCR. A mistura foi agitada no *vortex*, sendo transferida a uma coluna de aderência a DNA acoplada a um tubo cônico de 1,5 µL. Foi feita uma centrifugação a 14.000 g por 45 segundos. O excedente foi descartado, e 500 µL da solução de lavagem com etanol absoluto (na proporção de 1:4) foram adicionados à coluna, que novamente foi centrifugada (14.000 g por 45 segundos). O excedente foi descartado e para remover o excesso de etanol por centrifugação (14.000 g por 45 segundos).

A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL, na qual foi adicionado 30 µL de tampão de eluição em seu centro e foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 14.000 g por 1 minuto. O produto purificado foi armazenado em congelador a -20°C.

2.9 Quantificação

A quantificação das amostras foi feita em duas ocasiões, uma após a extração do DNA e outra após a purificação do produto de PCR. Em ambas utilizou-se a absorvância de 260 nm (para detecção de ácidos nucleicos) e 280 nm (para detecção de proteínas). A razão entre as duas absorvâncias, A260 e A280, deveria ser igual ou maior a 1,8 para que o material fosse considerado puro (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro Beckman Nanodrop (DU 640).

3 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

O sequenciamento de DNA foi realizado a partir do método do dideoxinucleotídeo. (Sanger *et al.*, 1977) com modificações para automatização e o uso de fluorocromos. Na reação de sequenciamento dos fragmentos foram utilizados 6,5 µL (10-20 ng de produto de PCR), água ultra pura deionizada e 1,0 µL do iniciador específico (3,2 pmol/µL), perfazendo um volume final de 7,5µL em placa de 96 poços. Depois, foram adicionados 1,5 µL de tampão 5x (fornecido em conjunto com o “Big Dye”); e 1 µL de “Big Dye” (Applied Biosystems). Esta reação foi realizada em termociclador (Veriti® Thermal Cycler) com 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a PCR foi feita a precipitação, iniciando com o acréscimo de 30 µL de isopropanol 75% em cada poço da placa. A solução foi agitada no *vortex* por 10 segundos e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos, sob abrigo da luz. Após esse período, a solução foi centrifugada a 4.000 g por 45 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram adicionados 50 µL de etanol 75% e mais uma vez foi levada a centrifugação a 4.000 g por 15 minutos. Posteriormente, o excesso de sobrenadante foi retirado e o conteúdo da placa foi seca em bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, no escuro.

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

Para analisar as amostras uma comparação foi feita entre as sequências referências dos genes *TP53* (NC_000017-9 do GenBank utilizada pelo IARC), *CDKN2A* (NG_007485.1 do GenBank) com a sequência das amostras utilizadas dada pelo sequenciamento. Essa comparação foi feita através dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* e *Sequencher 5.2.4 Version* da *Gene Codes*.

3.1 Modificação do DNA com bissulfito de sódio

O método de modificação do DNA a partir do bissulfito de sódio foi utilizado com fins de avaliar a região promotora do gene *CDKN2A* (*p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}*) (Herman *et al.*, 1996) e *ATM* (Vo *et al.*, 2004). Para a reação de modificação do DNA foi utilizado o Kit EPITECT (QIAGEN).

Na reação de modificação foi utilizado cerca de 50 a 100 ng de DNA genômico em um volume ajustado de 40 µL com água livre de RNase em cada reação. Em um microtubo de 1,5 mL, 85 µL da mistura de bissulfito dissolvido e 15 µL de tampão de proteção foram acrescentados ao DNA, formando um volume final de 140 µL. A solução foi levada ao termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller*, onde passou por três ciclos de desnaturação e incubação: desnaturação a 96 °C por 5 minutos e incubação a 60 °C por 25 minutos; desnaturação a 96 °C por 5 minutos e incubação a 60 °C por 85 minutos; desnaturação a 96°C por 5 minutos e incubação a 60°C por 175 minutos. Terminada a incubação do DNA, todo o conteúdo da reação foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 560 µL de tampão BL. A mistura foi transferida para a coluna de purificação posicionada sobre um tubo coletor, com posterior centrifugação por 1 minuto a 14.000 g. 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 g foi realizada, e o material depositado no tubo coletor foi descartado.

Posteriormente, foi adicionado à coluna 500 µL do tampão BD e esta foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi levado à centrifugação por 1 minuto a 14.000 g e o volume depositado no tubo coletor foi descartado.

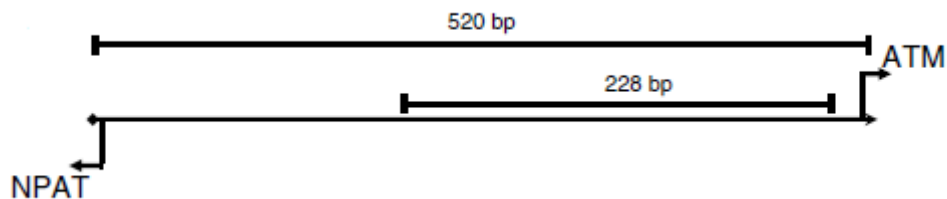
Adicionou-se à coluna 500 µL de tampão BW, para retirada do sal precipitado. O material foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 g e posteriormente o depósito foi descartado. Este processo de lavagem do DNA foi repetido e a coluna foi transferida para um tubo coletor. Foi realizada uma centrifugação por 4 minutos a 14.000 g para retirada de resquícios de reagentes que poderiam estar presentes na membrana. O material contido no tubo coletor foi descartado. Para eluir o DNA, adicionou-se 20 µL de tampão EB no centro da membrana e foi feita uma centrifugação a 12.000 g, por 1 minuto. O DNA modificado permaneceu armazenado a -20°C.

3.1.1 Reação em cadeia pela polimerase do gene *CDKN2A* (*p14^{ARF}* e *p16^{INK4a}*) e *ATM* (*MSP – Methylation Specific PCR*)

A região promotora do transcrito alternativo do gene *CDKN2A* (*p14^{ARF}*) é composta de seis ilhas CpGs localizadas na região 5' do gene. O início para a sequência não-metilada corresponde a 195 pb e para a metilada 201 pb, conforme a referência do GenBank número L41934 (Esteller *et al.*, 2000). Para a sequência de *p16^{INK4a}* os iniciadores se localizam no nucleótido 5' próximo ao sítio principal de transcrição do gene definido pelas seguintes referências, Genbank: X94154 e Herman *et al.*, (1996).

A região promotora do gene *ATM* corresponde a uma área de 520 pb de localização intragênica compartilhada com o gene *NPAT*, sendo que este último possui perfil de orientação contrária (Figura 8) (Byrd *et al.*, 1996).

Figura 8 - Representação da região promotora do gene *ATM*



Fonte: Vo *et al.*, 2004

As reações da PCR foram realizadas com aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 3,5 µL de água ultra-pura e estéril, 5,0 µL do tampão STR 10X (InvitrogenTM), 2 µL de dNTPs (10 mM) (InvitrogenTM), 3 µL de MgCl₂ (50 mM) (InvitrogenTM), 3,0 µL do par de iniciadores para cada região concentrados a 10 pmol/µL (Tabela 4), 0,5 µL da enzima *Taq Platinum* (1 U/µL InvitrogenTM) em um volume final de 50 µL.

O programa da PCR consistiu em primeira desnaturação à 94°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos à 94°C por 45 segundos, 60°C (para os iniciadores não-metilado e metilado) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada à 72°C por 7 minutos. As reações da PCR foram realizadas no termociclador *PTC-100TM Programmable Thermal Controller*.

Foi utilizado DNA da linhagem celular *DLD-1* como controle positivo. Esta linhagem é derivada de adenocarcinoma coloretal e apresenta metilação para as regiões promotoras *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}*. O DNA da linhagem foi cedido gentilmente pela pesquisadora Dra. Teresa de Souza Fernandez, do Centro Especializado de Médula Óssea (CEMO) do INCA. Como controle negativo foi utilizado DNA de linfócitos normais para as regiões metiladas estudadas.

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

Os produtos da *MSP* foram pré-analisados por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose 2% (Invitrogen™). 10 µL de cada amostra da PCR foi misturada a 5 µL do tampão de carregamento 1X (50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol). Utilizou-se, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 50 pares de bases (Invitrogen™). A eletroforese foi realizada a 100 V por 45 min e o gel foi fotografado com sua devida identificação.

Tabela 4 - Iniciadores dos promotores de $p14^{ARF}$, $p16^{INKa}$ e ATM , metilados e não metilados

Iniciadores	Denominação e sequência dos iniciadores	Tamanho do amplicon (pb)
$p14^{ARF}$ não metilado (Esteller <i>et al.</i> , 2000)	F - TTTTGGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT R - CACAAAACCCTCACTCACAACAA	132
$p14^{ARF}$ metilado (Esteller <i>et al.</i> , 2000)	F - GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC R - AAAACCCTCACTCGCGACGA	122
$p16^{INK4A}$ não metilado (Herman <i>et al.</i> , 1996)	F - TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R - CAACCCCAAACCACAACCATAA	151
$p16^{INK4A}$ metilado (Herman <i>et al.</i> , 1996)	F - TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R - GACCCCGAACCGCGACCGTAA	151
ATM não metilado (Vo <i>et al.</i> , 2004)	F - GTGGGGAGGATGATGAGGGT R - CACATCCAATATCACACAATCTCCA	179
ATM metilado (Vo <i>et al.</i> , 2004)	F - GCGGGGAGGACGACGAGGGC R - GCATCCAATATCACGCGATCTCCG	178

Legenda: F- “forward” = senso; R- “reverse” = anti-senso

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida vertical 10% não-desnaturante (Sambrook *et al.*, 1989)

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

O volume de 15 μ L das amostras provenientes da PCR foi misturado a 2 μ L do tampão de carregamento 6X (50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol) e aplicado nos poços. A eletroforese foi realizada por 60 minutos a 200 V, 70 mA e 50W com tampão TBE 0,5X.

Utilizou-se, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 50 e 100 pares de base (InvitrogenTM) de acordo com a disponibilidade e necessidade de marcação para gene analisado.

3.3 Detecção do material amplificado por coloração com nitrato de prata (Sambrook *et al.*, 1989)

O par de placas contendo o gel de poliacrilamida 10% foi aberto com a ajuda de uma espátula. O gel foi colocado em uma bandeja contendo solução fixadora (10% álcool metílico, 0,5% ácido acético). O gel foi mantido nesta solução, com agitação, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução de nitrato de prata 10% e o gel foi incubado com agitação, por mais 10 minutos.

Subsequentemente, o gel foi lavado em água destilada, por 10 segundos, e os produtos de amplificação revelados pela adição de solução de revelação (NaOH 1,5% e formaldeído 0,1%). O gel permaneceu nesta solução até que os produtos de amplificação estivessem definidos (aproximadamente 5 minutos). Para interromper a reação, adicionou-se a solução fixadora.

3.4 Avaliação estatística

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar a variável mutação e metilação (lesão, sangue, saliva e sangue ou saliva) com as variáveis de interesse (idade, idade da menopausa, malignidade, etilismo, tabagismo e histórico familiar de câncer). O teste *qui-quadrado de Fisher* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico SPSS, versão 17. Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa

forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil clínico das pacientes

Sessenta duas pacientes com diagnóstico BI RADS 3 e 4 foram incluídas no estudo. Todos os casos a partir dos exames de imagem foram considerados sugestivos de lesões malignas. As idades variaram de 18-80 anos com média de 53,17 e desvio padrão de 14,64. A faixa etária de maior número de pacientes foi de 45 a 60 anos, conferindo com a idade comum com o aparecimento de alterações na mama e menopausa. O perfil social e dados clínicos dos casos são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 - Dados sócio-clínicos dos casos estudados (continua)

Características	N=62	%
<i>Distribuição etária</i>		
≤49	29	47%
50-59	10	16%
≥59	20	32%
NI ¹	3	5%
<i>Cor da pele²</i>		
Branca	25	40,3%
Negra/Parda	25	40,3%
NI ¹	12	19,4
<i>Menarca (anos)</i>		
≤12	22	35%
>12	31	50%
NI ¹	9	15%
<i>Menopausa (anos)</i>		
≤40	3	5%
40-45	3	5%

Tabela 5 - Dados sócio-clínicos dos casos estudados (conclusão)

≥ 45	22	35%
<i>Histerectomia</i>	3	5%
<i>NM</i> ¹	23	37%
<i>NI</i> ¹	8	13%
<i>Filhos (número)</i>		
<i>Não teve filhos</i>	9	14%
<i>1</i>	8	13%
<i>2</i>	16	26%
<i>3</i>	9	14%
<i>>4</i>	8	13%
<i>NI</i> ¹	12	20%
<i>Uso de contraceptivo oral</i>		
<i>Sim</i>	32	52%
<i>Não</i>	18	29%
<i>NI</i> ¹	12	19%
<i>Histórico de câncer de mama/ovário</i>		
<i>Sim</i>	25	40%
<i>Não</i>	26	42%
<i>NI</i> ¹	11	18%
<i>Etilista</i>		
<i>Sim</i>	14	23%
<i>Não</i>	39	63%
<i>NI</i> ¹	9	14%
<i>Tabagista</i>		
<i>Sim</i>	15	24%
<i>Não</i>	38	62%
<i>NI</i> ¹	9	14%

Legenda: ¹NI: dado não informado; ² a cor da pele das pacientes é auto-declarada

Dentre os 62 casos avaliados, o diagnóstico histopatológico revelou 21 (44%) lesões benignas e 41 (66%) lesões malignas (tabela 6). Entre estas lesões, 10 casos foram

diagnosticados como fibroadenoma puro, 1 fibroadenoma associado com lesões papilíferas, 1 caso de adenose, 1 caso de ectasia ductal avançada, 1 papiloma, 4 hiperplasias atípicas, 1 caso de liponecrose, 1 hiperplasia sem atipia, 1 lesão papilífera, 3 casos de carcinoma ductal *in situ* puro, 24 carcinomas ductais infiltrantes, 7 carcinomas ductais infiltrantes associados a carcinomas ductais *in situ*, 1 carcinoma lobular infiltrante, 1 carcinoma mucinoso, 1 carcinoma micropapilar invasivo, 1 carcinoma micropapilar invasivo associado com carcinoma *in situ*, 1 carcinoma intraductal, 1 carcinoma ductal *in situ* associado com lesão mucinosa, 1 carcinoma ductal infiltrante associado a carcinoma intraductal.

O valor do diagnóstico imunistoquímico é essencial, sendo em parte responsável pela decisão da conduta terapêutica. Dentre os casos, um número expressivo (excluídos os casos de lesões benignas) não realizaram a avaliação imunoistoquímica para HER2 (Tabela 7). Além disso, entre as classificações moleculares cinco casos foram classificados como triplos negativos (Tabela 8). Em destaque, para o primeiro caso que apresentou linfonodo negativo, evolução para metástase e desfecho clínico para óbito.

Tabela 6 - Distribuição histológica dos tumores avaliados

<i>Subtipo histológico</i>	<i>n=62</i>	<i>%</i>
<i>CDI</i>	<i>24</i>	<i>39%</i>
<i>CDIS</i>	<i>3</i>	<i>5%</i>
<i>CDI - CDIS</i>	<i>7</i>	<i>11%</i>
<i>CLI</i>	<i>1</i>	<i>2%</i>
<i>Fibroadenoma</i>	<i>11</i>	<i>18%</i>
<i>Outros</i>	<i>16</i>	<i>26%</i>

Tabela 7 - Marcadores imunohistoquímicos para as lesões malignas avaliadas

<i>Receptores</i>	<i>n=41²</i>	<i>%</i>
<i>Estrogênio</i>		
<i>Positivo</i>	<i>15</i>	<i>37%</i>
<i>Negativo</i>	<i>7</i>	<i>17%</i>
<i>NI¹</i>	<i>19</i>	<i>46%</i>
<i>Progesterona</i>		
<i>Positivo</i>	<i>16</i>	<i>39%</i>
<i>Negativo</i>	<i>7</i>	<i>17%</i>
<i>NI¹</i>	<i>18</i>	<i>44%</i>
<i>HER2</i>		
<i>Positivo</i>	<i>4</i>	<i>10%</i>
<i>Negativo</i>	<i>12</i>	<i>29%</i>
<i>NI¹</i>	<i>25</i>	<i>61%</i>

Legenda: ¹NI: dado não informado; ²excluídos os casos de lesões benignas

Tabela 8 - Perfil clínico e histopatológico dos casos triplo-negativos

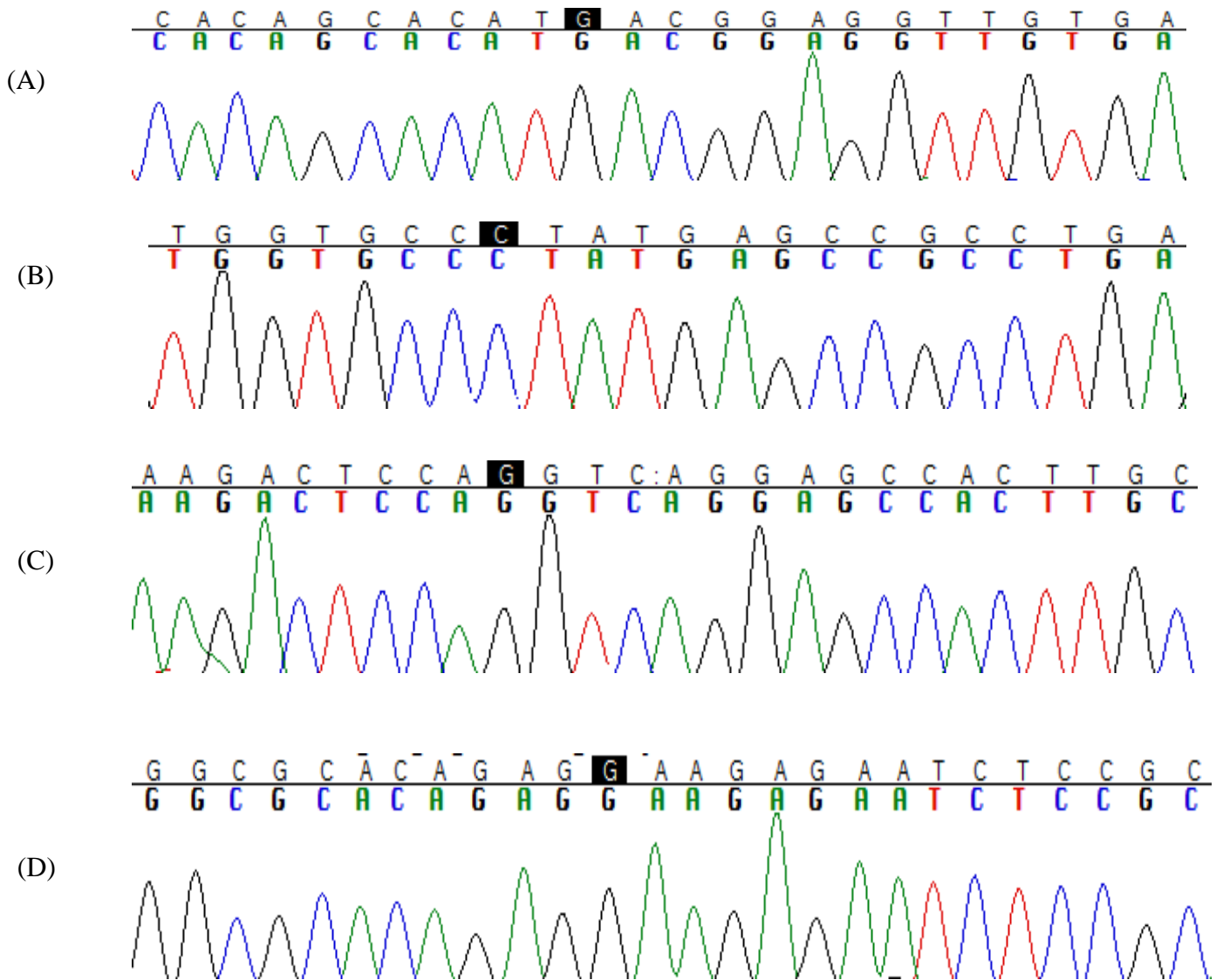
<i>Casos</i>	<i>Idade</i> <i>(anos)</i>	<i>Menopausa</i> <i>(anos)</i>	<i>Menarca</i> <i>(anos)</i>	<i>Histopatológico</i>	<i>Grau</i>	<i>Linfonodo</i>	<i>Metástase</i>	<i>Óbito</i>
1	41	12	Não	CDI – CDIS	3	Livres	Sim	Sim
2	51	13	49	CDI – CDIS	3	NI ²	Não	Não
3	42	9	Não	CDI	3	NI ²	Não	Não
4	46	12	Não	CDI	3	12	Não	Não
5 ¹	43	NI ²	NI ²	CDI	3	Livres	Não	Não

Legenda: ¹ câncer de mama hereditário – não comprovado por avaliação genética, mas por frequência de casos na família; ² NI: dado não informado

4.2 Análise das sequências do gene *TP53*

Para os exons 5 ao 8 foram avaliados 28 casos e para os exons 4 e 9, 62 casos. O sequenciamento automático não revelou mutações somáticas. As análises são demonstradas na figura 9 pelos eletroferogramas gerados, a partir do programa *Sequencer 5.2.4 Version* da *Gene Codes*.

Figura 9 - Eletroferogramas de análise dos exons 5 (A), 6 (B) 7 (C) e 8 (D) do gene *TP53*

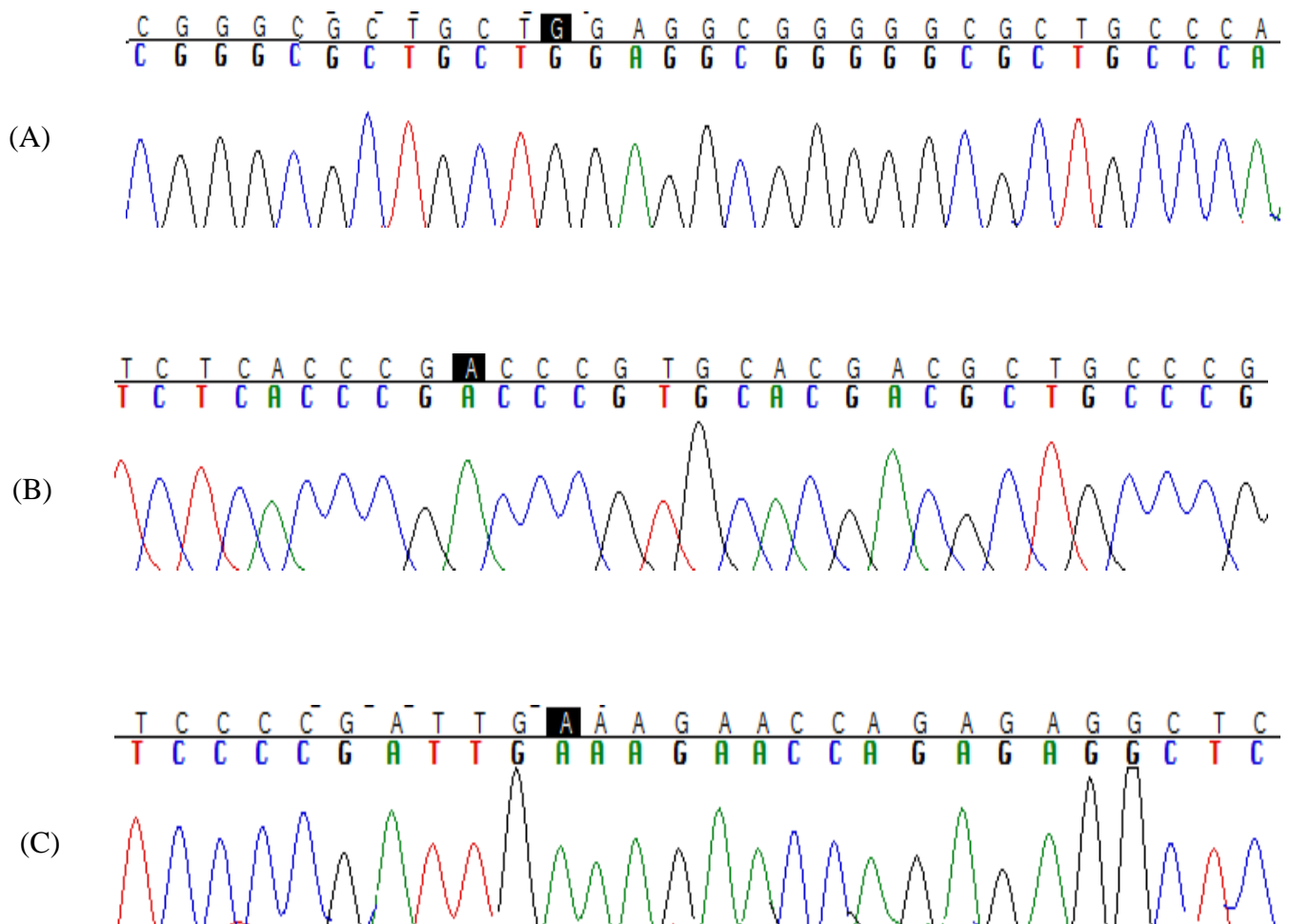


4.3 Análise das sequências do gene *CDKN2A*

Foram avaliadas 62 amostras de DNA provenientes das lesões suspeitas de malignidade para a região codificante do gene *CDKN2A* (exon 1 ao 3). Nenhuma mutação somática foi encontrada na região gênica avaliada.

As análises são demonstradas na figura 10 pelos eletroferogramas gerados, a partir do programa *Sequencer 5.2.4 Version da Gene Codes*.

Figura 10 - Eletroferogramas de análise dos exons 1 (A), 2 (B) e 3 (C) do gene *CDKN2A*

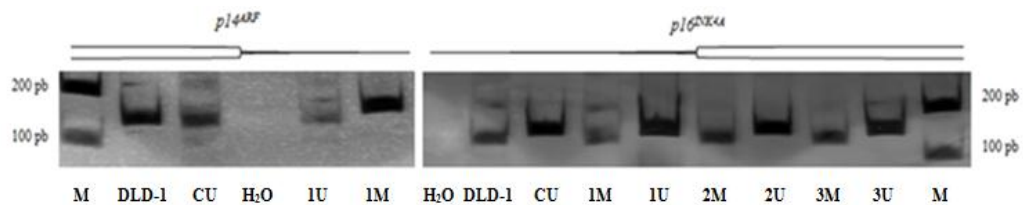


4.4 Perfil de metilação de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$

Foi avaliado o perfil de metilação das regiões promotoras de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$ de 62 amostras de DNA provenientes das lesões mamárias, 39 amostras de DNA a partir dos linfócitos periféricos e 39 amostras de DNA salivar.

A metilação nas lesões mamárias foi detectada em um caso para $p14^{ARF}$ (1,6%) e em três (4,8%) para $p16^{INK4a}$. Um caso foi positivo para ambos os promotores (figura 11 e tabela 9 e 10).

Figura 11 - Perfil de metilação para as regiões promotoras de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$ em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por prata



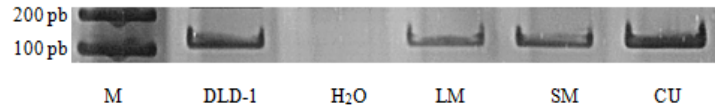
Legenda: Sentido em esquerda: M – marcador de peso molecular; *DLD-1* – controle positivo de metilação para $p14^{ARF}$ (132 pb); CU – controle positivo para ausência de metilação de $p14^{ARF}$ (122 pb); 1U – DNA de lesão mamária não metilado para $p14^{ARF}$; 1M – DNA de lesão mamária metilado para $p14^{ARF}$; Sentido em direita do gel: *DLD-1* controle positivo para metilação de $p16^{INK4a}$ (150 pb); CU – controle positivo para ausência de metilação de $p16^{INK4a}$ (151 pb); 1M, 2M, 3M – Casos de lesões mamárias metiladas para $p16^{INK4a}$; 1U, 2U, 3U – Casos de lesões mamárias não metilados para $p16^{INK4a}$; M – marcador de peso molecular

Dentre as 39 amostras de DNA do sangue periférico avaliadas, 10 (26%) foram positivas para $p14^{ARF}$ e 16 (41%) para $p16^{INK4a}$ (Figuras 12 e 13 e tabelas 9 e 10). Dos casos de saliva avaliados, 1/39 (2,6%) apresentaram metilação para $p14^{ARF}$ e 6/39 (15,4%) apresentaram metilação positiva para $p16^{INK4a}$ (Figuras 12 e 13 e tabelas 9 e 10).

A distribuição global de metilação de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$ nas amostras avaliadas segundo a histopatologia da lesão estão representadas nas tabela 11.

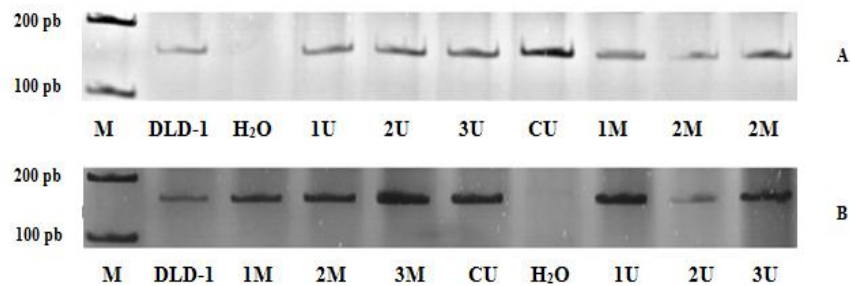
Não foi encontrada nenhuma associação estatística significativa entre os achados de metilação e as variáveis clínico-patológicas avaliadas para $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$ (Anexos D e E)

Figura 12 - Análise do perfil de metilação de $p14^{ARF}$ em DNA extraído de linfócitos de sangue periférico e saliva, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por nitrato de prata



Legenda: M – marcador de peso molecular; *DLD-1* - controle positivo de metilação para $p14^{ARF}$ (132pb); LM – caso de DNA linfocitário metilado para $p14^{ARF}$; SM – caso de DNA extraído de saliva metilado para $p14^{ARF}$; CU – controle positivo não metilado para $p14^{ARF}$ (122pb)

Figura 13 - Análise do perfil de metilação de $p16^{INK4a}$ em DNA extraído de linfócitos de sangue periférico (A) e saliva (B), a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por nitrato de prata



Legenda: (A) M – marcador de peso molecular; *DLD-1* – controle positivo de metilação para $p16^{INK4a}$ (150 pb); 1U, 2U, 3U – casos cujo DNA linfocitário não apresentaram metilação para $p16^{INK4a}$; CU – controle positivo para ausência de metilação para $p16^{INK4a}$ (151 pb); 1M, 2M, 3M – casos cujo DNA linfocitário apresentaram metilação para $p16^{INK4a}$ (B) – marcador de peso molecular; *DLD-1* – controle positivo de metilação para $p16^{INK4a}$ (150 pb); 1M, 2M, 3M – casos cujo DNA extraído de saliva apresentaram metilação para $p16^{INK4a}$; CU – controle positivo para ausência de metilação para $p16^{INK4a}$ (151 pb); 1U, 2U, 3U – casos cujo DNA de saliva não apresentaram metilação para $p16^{INK4a}$

Tabela 9 - Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para $p14^{ARF}$

	Benigno n=21 (%)	Maligno n=41 (%)
<i>Lesão</i>	0	1 (2,4%)
<i>Sangue</i>	2 (5,1%)	8 (19,5%)
<i>Saliva</i>	0 (0%)	1 (2,4%)

Tabela 10 - Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para $p16^{INK4a}$

	<i>Benigno n=21 (%)</i>	<i>Maligno n=41 (%)</i>
<i>Lesão</i>	0	3 (7,3%)
<i>Sangue</i>	4 (19,4%)	12 (29%)
<i>Saliva</i>	1(4,8%)	5 (12%)

Tabela 11 - Distribuição dos casos metilados para $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$ *

<i>n=18</i>	<i>Tumor ($p14^{ARF}$ – $p16^{INK4a}$)</i>	<i>Sangue ($p14^{ARF}$ – $p16^{INK4a}$)</i>	<i>Saliva ($p14^{ARF}$ – $p16^{INK4a}$)</i>	<i>Idade</i>	<i>Menarca – Menopausa²</i>	<i>Histopatológico</i>
1	+/+	+/+	+/+	70	12- 34	CDI
2	-/+	-/+	-/+	80	12 - 59	CI
3	-/+	-/+	-/+	58	13 – 39	CDIS - Mucinoso
4	-/-	+/+	-/-	61	N ¹ -52	CDI - CDIS
5	-/-	+/+	-/+	78	11 – 53	CDI
6	-/-	+/+	-/+	59	13 – 53	CDI – CDIS
7	-/-	+/+	+/+	48	13 – N ²	Hiperplasia Atípica
8	-/-	+/+	N ¹ /N ¹	49	14 – 49	CDI- CDIS
9	-/-	+/+	N ¹ /N ¹	63	16 – 53	CDI – CDIS
10	-/-	-/+	-/-	61	15 – 57	CDI – CDIS
11	-/-	-/+	N ¹ /N ¹	71	N ¹ – N ²	CDI – CI
12	-/-	+/+	N ¹ /N ¹	18	12 – N ²	Fibroadenoma
13	-/-	+/-	N ¹ /N ¹	42	9 – N ²	CDI
14	-/-	-/+	-/-	44	13 – N ²	Hiperplasia atípica
15	-/-	-/+	N ¹ /N ¹	43	12 – N ²	Hiperplasia atípica
16	-/-	+/+	-/-	47	13 – N ²	CDIS
17	-/-	-/+	N ¹ /N ¹	38	14 – N ²	Lesão papilífera
18	-/-	-/+	N ¹ /N ¹	70	N ¹ – N ²	CDI - CDIS

Nota: * tabela representativa somente dos tumores, sangue e saliva que foram positivas para metilação de $p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$

Legenda: N¹ ausência de material, dados e/ou inviabilidade de amplificação; N² – não teve menopausa

4.5 Perfil de metilação da região promotora do gene *ATM*

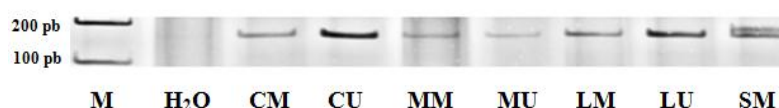
Foi avaliado o perfil de metilação da região promotora do gene *ATM* de 62 amostras de DNA provenientes das lesões da mama, 39 amostras de DNA a partir dos linfócitos periféricos e 39 amostras de DNA da saliva destes casos.

A avaliação revelou metilação para 33 (53,2%) casos no DNA extraído da lesão mamária, 16/39 (41%) casos em DNA extraído de linfócitos sanguíneos, sendo que destes, 8 casos apresentaram positividade somente no sangue e não na lesão. A saliva apresentou metilação para 9/39 (23%) casos (Figura 14 e tabela 12).

A distribuição global de positividade de metilação em *ATM* nas amostras avaliadas, segundo a histopatologia da lesão, está representada na tabela 13.

Não foi encontrada nenhuma associação estatística significativa entre os achados de metilação e as variáveis clínico-patológicas avaliadas para *ATM* (Anexo F)

Figura 14 - Análise do perfil de metilação da região promotora do gene *ATM* em lesão mamária, sangue e saliva dos casos avaliados e revelados em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante corado por nitrato de prata



Legenda. Posição em esquerda do gel: M – marcador de peso molecular; CM – controle positivo de metilação para a região promotora de *ATM* (178 pb); CU – controle positivo para ausência de metilação do promotor *ATM* (179 pb); MM – DNA de lesão mamária metilado para *ATM*; MU – DNA de lesão mamária não metilado para *ATM*; LM – DNA linfocitário metilado para *ATM*; LU – DNA linfocitário não metilado para *ATM*; SM – DNA salivar metilado para *ATM*

Tabela 12 - Perfil de benignidade e malignidade dos casos metilados para *ATM*

	Benigno n=21 (%)	Maligno n=41 (%)
<i>Lesão</i>	7 (33,3%)	26 (63,4%)
<i>Sangue</i>	6 (28,7%)	10 (24,3%)
<i>Saliva</i>	4 (19,0%)	4 (9,7%)

Tabela 13 - Distribuição dos casos metilados para a região promotora de *ATM*

<i>n=41</i>	<i>Tumor (ATM)</i>	<i>Sangue (ATM)</i>	<i>Saliva (ATM)</i>	<i>Idade</i>	<i>Menarca - Menopausa</i>	<i>Histológico</i>
1	-	+	N ¹	41	12 - N ²	Fibroadenoma
2	-	+	N ¹	43	12 - N ²	HA
3	-	+	N ¹	61	12 - 53	CDI
4	-	+	-	63	15 - 56	Fibroadenoma
5	+	-	-	70	12 - 34	CDI
6	+	+	-	80	12 - 59	CI
7	+	N ¹	N ¹	45	15 - N ²	CDI
8	+	N ¹	N ¹	80	13 - 45	CMI
9	+	-	N ¹	47	N - 42	Adenose
10	+	-	+	59	12 - 53	CDI - CDIS
11	+	N ¹	N ¹	42	15 - N ²	Fibroadenoma
12	+	N ¹	N ¹	51	N - 49	CDI
13	-	+ ¹	N ¹	41	12 - N ²	Fibroadenoma
14	+	-	N ¹	42	15 - N ²	CDI
15	+	-	N	43	N - 43	Ectasia
16	-	+	-	61	12 - 57	CDI - CDIS
17	+	N ¹	N	N	15 - N ¹	CDI
18	+	N ¹	N ¹	56	N - 51	CMI
19	+	+	+	51	13 - 39	CDI - CMI
20	+	-	N ¹	56	13 - 48	CDI - CDIS
21	+	+	N ¹	29	9 - N ²	CDI
22	+	+	N ¹	71	12 - N ¹	CDI - CI
23	+	-	N ¹	N	N ¹ - N ¹	Fibroadenoma
24	+	-	N ¹	81	N ¹ - 35	CLI
25	+	-	N ¹	39	11 - N ¹	CDI
26	+	+	+	47	14 - N ²	CDIS
27	+	-	-	48	13 - N ²	HA

28	-	+	N ¹	42	13 - N ²	CDI
29	+	+	+	44	13 - N ²	HA
30	+	N ¹	N ¹	43	9 - N ²	CDI
31	+	-	N ¹	79	13 - 50	CMI
32	+	+	N ¹	63	12 - 53	CDI - CDIS
33	+	+	+	77	13 - 49	CDI
34	+	+	+	18	12 - N ²	Fibroadenoma
35	+	-	N ¹	38	14 - N ²	Lesão papilífera
36	+	N	N ¹	25	13 - N ²	Fibroadenoma
37	+	N	-	58	12 - 40	CDI
38	-	-	+	N	N ¹ - N ¹	Fibroadenoma
39	+	-	+	42	13 - N ²	HA
40	+	N	N ¹	70	15 - 38	CDI - CDIS
41	+	-	N ¹	38	15 - N ²	Fibroadenoma – Lesões papilíferas

Nota: * tabela representativa somente dos tumores e amostras de sangue e saliva que foram positivas para metilação de *ATM*

Legenda: N¹ - ausência de material, dados e/ou inviabilidade de amplificação; N² – não teve menopausa

5 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nos exames de imagem, Brooks *et al.*, (2009) descrevem que a cada duas mulheres que recebem diagnóstico mamográfico anual, uma deverá ter pelo menos um resultado falso-positivo em sua vida. Dessa forma, a busca de marcadores moleculares com especificidade e sensibilidade que contribuam para o diagnóstico precoce da lesão se faz necessária, principalmente na tentativa de minimizar erros e, evitar métodos invasivos.

Os avanços na caracterização molecular do câncer de mama possibilitaram desvendar os principais genes envolvidos na doença e determinar o seu fenótipo. Porém, suas aplicações ainda são restritas a confirmação histopatológica e nem sempre a aplicação das assinaturas gênicas são seguras devido à heterogeneidade do tumor. Isso se aplica justamente as lesões impalpáveis, pois o histopatológico é muito variável, e muitas das quais compartilham de eventos considerados precoces para a carcinogênese. Os resultados de avaliação destas lesões vêm comprovar a heterogeneidade do tumor justamente pelo fato de que mesmos nos casos mais agressivos e de pior prognóstico não foram encontradas mutações ou alterações somáticas que confirmassem o seu fenótipo similar com os de lesões palpáveis já estudadas (Olivier *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2014).

A grande dificuldade na oncologia clínica é determinar com segurança, quais os marcadores já descritos seriam capazes de diferenciar as lesões benignas autênticas, das malignas; além de prever a evolução desta lesão impalpável. A perspectiva inicial foi pontuar dentre os principais genes supressores tumorais envolvidos na carcinogênese mamária, os que pudessem desvendar a tendência de uma lesão dita suspeita para malignidade. Porém, há uma ampla dificuldade na seleção de casos com lesões impalpáveis, pois parte destas correspondem as classificações BI RADS 3 ou 4, que remetem ao grupo das lesões palpáveis.

Embora o câncer de mama seja um dos cânceres mais estudados em todo o mundo, as diversas ferramentas diagnósticas utilizadas ainda são insuficientes para se alcançar uma detecção precoce e capaz de promover medidas mais conservadoras. Os resultados encontrados nos experimentos confirmam as evidências de quem nem sempre a evolução da doença pode ser prevista. A grande importância de se descrever a avaliação molecular dos genes supressores tumorais é detalhar os mecanismos que podem estar envolvidos na carcinogênese, não só para o aprimoramento de técnicas prognósticas mais eficientes, mas também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas.

A descoberta de modificações epigenéticas na carcinogênese, em especial, no câncer de mama, desperta a iniciativa pela busca de marcadores circulantes em fluidos biológicos como, por exemplo, nas células imunológicas do sangue periférico, plasma e saliva. Li *et al.*, (2003) determinam que os marcadores de metilação do DNA possam ser mais informativos, e mais estáveis, quando comparados aos demais biomarcadores como o RNA e as proteínas que podem ser alterados, ou minimizados, rapidamente quando o indivíduo é exposto a ambientes diferentes.

5.1 Perfil molecular do gene supressor tumoral *TP53* em lesões BI-RADS 4

As alterações descritas no gene supressor tumoral *TP53*, constituem as anormalidades moleculares mais frequentes nos tumores sólidos, tornando-se o alvo mais comum de busca por alterações genéticas no processo neoplásico (Hainaut 2000; Hurt *et al.*, 2006; Vousden & Lane, 2007).

Estudos comprovam que mutações somáticas no gene *TP53* em carcinomas mamários atingem uma taxa de 25% (IARC, 2014), sendo que a maioria destas alterações está localizada no domínio central (exon 5 ao 8). Determinada por sequências conservadas, as alterações nestas regiões levam a instabilidade na funcionalidade do gene e resultam na codificação de uma proteína anormal, suscetível ao acúmulo e/ou perda de função (Zhou *et al.*, 2009).

Dentre as principais rotas de atuação do gene *TP53*, este exerce papel central no reparo, ciclo celular e metabolismo celular. A ausência de alterações moleculares nestas vias leva-se a uma maior sensibilidade à quimioterapia, em contrapartida, a quimioresistência é considerada umas das principais respostas às mutações no gene que irão justificar falhas no tratamento e os elevados índices de morte por câncer (Olivier *et al.*, 2006).

Embora em nosso trabalho não tenha sido detectada qualquer mutação somática na região codificante (exon 4-9), as mutações em *TP53* variam muito devido à heterogeneidade do tumor. Bai *et al.*, (2014) avaliaram 105 tumores de mama, dos quais 15,2% apresentaram mutações que foram estatisticamente significativas quando associadas à idade avançada das mulheres, e a negatividade dos receptores hormonais. Olivier *et al.*, (2006) corroboram com os resultados, pois as mutações encontradas em seu estudo foram mais frequentes em carcinomas ductais e medulares, determinados pelo fenótipo mais agressivo. Outras variáveis como grau histológico elevado, linfonodo positivo e baixa porcentagem de receptores

hormonais foram estatisticamente associados e significativos com as mutações em *TP53*. Outros trabalhos reafirmam a associação das mutações frequentes em *TP53* como significativamente presentes em tumores mamários com um pior prognóstico (Feki *et al.*, 2004, Feng *et al.*, 2007).

Ao contrário, o estudo de Zhou *et al.*, (2009) contesta a hipótese que as mutações somáticas seja um evento tardio da lesão. Em 118 amostras tumorais da mama estudadas e subdividas em grupos puros e mistos de CDIS e CDI, os autores encontram uma taxa de 16,1% de mutações somáticas. Quando realizadas as análises nos tumores mistos, por microdissecção de separação, foram encontradas as mesmas mutações nos CDIS e CDI separadamente. Os resultados encontrados sugerem que nem sempre a lesão molecular antecede, ou ainda, seja consequência da progressão da massa tumoral.

Aproximadamente, 30% dos cânceres de mama demonstram alguma mutação em *TP53*, mas esta frequência sofre flutuações mais do que 80% entre o tipo *basal-like* e menos do que 15% no subgrupo luminal-A (Sorlie *et al.*, 2001). Baseado nestas flutuações, Dumay *et al.*, (2012), confirmam o aumento de frequência de mutações no gene *TP53* em lesões mamárias do tipo *basal-like*. Em outro estudo de revisão, a avaliação epigenética no gene detectou a hipermetilação da região promotora sendo associada a outras neoplasias, tais como a leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiplo, células de glioma maligno e metástase cerebral de tumores sólidos (Taghavi *et al.*, 2010).

Embora sejam diversos os trabalhos descritos sobre a presença de mutações no gene *TP53* em lesões mamárias, os resultados encontrados em nosso trabalho reafirmam a hipótese de que as alterações somáticas estejam principalmente associados aos casos avançados e de pior prognóstico.

5.2 Perfil molecular do gene supressor tumoral *CDKN2A* em lesões BI-RADS 4

As mutações somáticas no gene *CDKN2A* não são bem exploradas na carcinogênese mamária (Dębniak *et al.*, 2007), justamente por não apresentarem taxas significativas de alterações moleculares, comparadas, por exemplo, com a frequência de mutações detectadas em *TP53*. Considerado ser um forte preditor de susceptibilidade para histopatologia e evolução na carcinogênese (Dębniak *et al.*, 2007), o gene *CDKN2A* está diretamente relacionado aos melanomas hereditários (Ranade *et al.*, 1995). Mais além, as mutações

germinativas detectadas neste gene, elevam o risco para o desenvolvimento de carcinomas mamários nestas famílias (Borg *et al.*, 2000).

Dentre as principais mutações avaliadas, as alterações estão localizadas principalmente no exon 2 e são do tipo: *non-sense*, *missense* ou *frameshift* (Kamb *et al.*, 1994). Em confirmação, Sinha *et al.*, (2008) detectaram a presença de mutações em 3/47 carcinomas mamários iniciais e 1/59 em carcinomas avançados, destacando a forte associação destas mutações no exon 2 com tumores de alto grau histopatológico.

Embora os resultados de avaliação molecular sejam contraditórios, a inativação do gene tem sido relatada em quase metade dos cânceres (Rocco *et al.*, 2001). Estas alterações de expressões ainda não são totalmente elucidadas, pois não foram detectados resultados favoráveis ao prognóstico em neuroblastomas, cânceres cervicais, ovário, mama e tumores da próstata (Li *et al.*, 2011). Entretanto, estudos a partir da imunistoquímica (Peurala *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2013) demonstraram uma forte associação de sua expressão a melhora no prognóstico dos casos. Estes resultados estão associados principalmente pela dualidade de sinalização celular do *CDKN2A*, podendo assumir ser um marcador de mediação da senescência celular (parada da proliferação celular), ou mesmo, marcador da perda de controle de ação do crescimento pela desregulação da proteína Rb (retinoblastoma) (Radisky *et al.*, 2011).

Shan *et al.*, (2013) descrevem a marcação da proteína p16 em níveis diferentes nos CDIS e CDI. Nos CDIS a expressão esteve reduzida nos tipos luminais-A, porém quando avaliada nos CDIS triplo negativos, houve um aumento de expressão na marcação. Dos CDIS (n=41) positivos para p16, um terço destes apresentaram risco maior de desenvolvimento em cânceres de mama avançados. Estes resultados sugerem o papel do gene como forte marcador de predição de evolução e prognóstico do tumor. Além disso, nos CDIS a baixa positividade de reação esteve associada aos tumores em mulheres com menarca tardia, histologia de proliferação celular reduzida e fenótipo de tumores bem diferenciados, variáveis estas que não tiveram associações significativas nos CDI. Em contradição, Peurala *et al.*, (2013) e Choi *et al.*, (2013) descreveram que tumores positivos para p16 estão significativamente associados com uma maior sobrevida livre da doença.

Radisky *et al.*, (2011) também avaliando a expressão do gene por marcação da proteína em tecido não encontraram associação de risco para desenvolvimento de câncer em mulheres com hiperplasias na mama, positivas para a proteína p16. Dos 233 casos avaliados, 47 evoluíram para câncer de mama esporádico em uma média de 14,5 anos, sendo destes, 32%

na idade do diagnóstico positivas para p16. Mesmo com tais resultados encontrados, somente a idade avançada estabeleceu uma marcação estatística significativa.

Embora não haja estudos atuais de investigação de alterações somáticas no gene *CDKN2A*, alterações moleculares de perda de heterozigidade no locus 9p21 são comuns (Gorgoulis *et al.*, 1998). Stankovic *et al.*, (2014) avaliando o gene *CDKN2A* por meio de marcadores de instabilidade específicos, destacaram as alterações moleculares em 5/49 das amostras mamárias de estágio inicial. Em outra avaliação, Sinha *et al.*, (2008) encontraram uma taxa de perda de heterozigidade em 42% dos tumores em estágio inicial, e em 33% em tumores de estágio avançado.

Além das mutações encontradas no exon 2, este fragmento possui as principais regiões polimórficas do gene e vem sendo descritas como possíveis alvos de susceptibilidade ao câncer de mama. As principais frequências de polimorfismo se localizam no exon 2 (A57V, G89D, A148T), embora tenham sido descritas mais que cinco polimorfismos na região promotora 5' UTR (Goldstein *et al.*, 2008; Debniak *et al.*, 2007). Dentre os nossos resultados foram encontrados dois casos para o polimorfismo A148T (uma lesão benigna e outra maligna), porém não foi realizada a avaliação estatística de penetrância, por não se tratar de um estudo caso-controle.

O sequenciamento direto é considerado uma técnica de alta tecnologia e de precisão na sensibilidade, sendo que mesmo com as possibilidades de contaminação de células não tumorais no amostral, o sequenciamento é capaz de detectar células mutadas em uma taxa mínima estimada de 10-15% (Zhou *et al.*, 2009).

Neste trabalho não foram encontradas mutações somáticas no gene *CDKN2A*. Estes resultados são esperados quando confrontados com a literatura referenciada, pois não há uma taxa bem estabelecida, nem variáveis histopatológicas do tumor que direcionem e determinem com segurança a probabilidade de detecção destas mutações. Mesmo nos casos mais agressivos do amostral avaliado não foram detectadas qualquer alteração somática.

5.3 Epigenética na carcinogênese mamária

A metilação nas ilhas CpG localizadas nos sítios promotores dos genes tem sido descrita como uma importante alteração gênica responsável pela inativação parcial ou total do gene. Estas modificações são comuns e essenciais para a manutenção da fisiologia celular, porém quando alteradas, em casos de hipermetilação, este evento molecular torna-se um fator de risco para o desenvolvimento e progressão tumoral (Jones & Michels, 2011).

O silenciamento gênico pela metilação tem sido detectado em quase todos os tumores e caracterizado como fator de risco para a carcinogênese mamária (Askari *et al.*, 2013). Vários genes chaves que controlam a integridade do genoma estão frequentemente inativados por metilação, por exemplo: genes supressores tumorais, de adesividade celular, regulação do ciclo celular, divisão celular, e de controle da apoptose (Jones & Michels, 2011). A metilação do gene *CDKN2A* é bastante explorada e provavelmente uma das mais comuns ao microambiente tumoral, sendo que alguns estudos comprovam sua associação de metilação ao tipo mais agressivo do tumor mamário (Sharma *et al.* 2007; Arima *et al.*, 2012; Bohn *et al.*, 2010).

A determinação de um bom biomarcador depende do valor da especificidade e sensibilidade. Nem sempre estes valores são determinados e específicos que possam ser aplicados na clínica como diagnóstico. A detecção de metilação do DNA tornou-se uma ferramenta promissora e possível de ser detectada no DNA tumoral circulante. Este fator tem aumentado às esperanças na determinação do fenótipo do tumor e predição de possíveis riscos de metástases, variáveis de proliferação celular, índice mitótico, entre outros, assim como a avaliação de resíduo tumoral mínimo pós-tratamento (Lee *et al.*, 2012).

Sabe-se que a metilação do DNA é mediada pela família das DNA metil-transferases (DNMTs), e a possibilidade de bloqueio destas enzimas tornou-se alvo de terapêutica. Recentemente inibidores destas enzimas tem sido aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento das síndromes mielodisplásicas (Kaminskas *et al.*, 2005). Outros estudos em testes, utilizando a decitabina (isto é, 5-aza-29-desoxicidina), um análogo da 5-azacitidina (aprovada pelo FDA) está sob investigação para o tratamento da leucemia mielóide aguda (LMA) e câncer colorretal (Karahoca & Momparler *et al.*, 2013, Jones & Baylin, 2002). Além destes, outros ensaios *in vitro* utilizando a decitabina e o ácido suberanilohidroxâmico (SAHA, um inibidor da histona deacetilase) é capaz de promover a

sensibilização das células cancerígenas do cólon induzindo a apoptose celular (Yang *et al.*, 2012).

Dessa forma, variações epigenéticas no tumor e nos demais fluidos corporais tem propiciado a criação de testes e ferramentas que favoreçam o acompanhamento da progressão tumoral, ou mesmo, permitir a detecção do tumor a partir de genes alvos alterados na carcinogênese mamária.

5.4 Metilação de $p14^{ARF}$

A proteína p14 é codificada a partir de três exons correspondentes ao gene *CDKN2A*, localizado na região cromossômica 9p21. O primeiro exon compartilha de um *splicing* alternativo responsável pela codificação da proteína p14 (Sherr, 2001). *In vivo* p14 interage com MDM2 responsável por minimizar a degradação contínua de p53. Teoricamente, a inativação de p14 é resultado de um mecanismo de proteção para minimizar mutações no gene *TP53* (Pomerantz *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Os primeiros relatos de clonagem da região promotora do gene $p14^{ARF}$ descreve as ilhas CpG desta região extremamente metiladas em linhagens de células de câncer colorretal (Robertson & Jones, 1998).

A avaliação das alterações epigenéticas tem revelado a metilação em $p14^{ARF}$ como um útil marcador para estado patológico, resultado clínico e prognóstico de câncer de bexiga, cólon, carcinoma escamoso oral, câncer de pulmão de células não pequenas e osteossarcoma (Shintani *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2005; Kawamoto *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Badal *et al.*, 2008; Sailasree *et al.*, 2008).

Dentre os resultados encontrados neste trabalho, somente 1/62 (1,61%) caso de lesão mamária foi positiva para metilação de $p14^{ARF}$. Neste caso o diagnóstico histopatológico final foi de CDI, grau histológico 2, e variável clínico-patológica com idade avançada, característica esta, fator de risco para modificações epigenéticas no DNA. Neste mesmo caso houve positividade de metilação para DNA linfocitário e DNA salivar. Embora se esperasse um tumor com chances de evolução tumoral e de pior prognóstico, o caso não manifestou qualquer fenótipo neste sentido. Ainda mais, as variáveis avaliadas (idade, idade da menopausa, malignidade, etilismo, tabagismo e histórico familiar de câncer) não apresentaram qualquer associação estatística significativa.

A detecção de metilação em $p14^{ARF}$ em amostras tumorais são variáveis de acordo com o tipo tumoral e os diversos fatores clinico-patológicos. Askari *et al.*, (2013) avaliando tumores infiltrativos da mama detectaram a metilação na região promotora de $p14^{ARF}$ em 16/150 casos, correspondendo a uma taxa de 10,6%. Dentre as avaliações estatísticas, a metilação de $p14^{ARF}$ esteve associada aos três graus tumorais, havendo uma maior associação ao grau histológico tumoral inicial. Mais além, a metilação do promotor esteve associada a mulheres com idade acima de 50 anos. Estas mesmas associações foram descritas por Bagadi *et al.*, (2008).

Em outros estudos com amostral tumoral que não de mama, Esteller *et al.*, (2000) descreveram uma alta frequência de metilação da região promotora do gene $p14^{ARF}$ em câncer colorretal; e em câncer de bexiga, a alteração epigenética foi verificada em 35% nas amostras estudadas (Essel-Dulaimi *et al.*, 2004). Mesmo com frequências representativas, nenhum destes trabalhos apresentaram qualquer tipo de associação com as variáveis clínicas dos casos. Já Brown *et al.*, (2004) destacaram que em carcinomas cutâneos de células escamosas, a região promotora de $p14^{ARF}$ demonstrou uma frequência de metilação em 61,1%, e que as alterações epigenéticas estiveram associadas ao grau histológico do tumor e o estágio tradicional de Dukes. Em tumores orais e de células escamosas da laringe, Kis *et al.*, (2014) encontraram hipermetilação para $p14^{ARF}$ em 4/30 (13,3%) tumores orais e em 4/28 (14,3%) tumores escamosos da laringe.

Dentre as avaliações de metilação no sangue periférico foi verificada a positividade em 10/39 (26%) amostras, sendo 2/21 (9,5%) tumores benignos e 8/41 (19,5%) tumores malignos. As variáveis clínicas-patológicas correlacionadas não apresentaram associações estatísticas significativas.

As relações de metilação de $p14^{ARF}$ no sangue periférico e o risco para câncer de mama não foram possíveis de serem confirmadas em nosso trabalho sendo que Bodoor *et al.*, (2014), embora tenha feita a avaliação em células leucêmicas, encontrou uma frequência de positividade para metilação entre os casos de leucemia linfóide crônica (25%) e leucemia mieloide aguda (8%). Estes valores, quase que similares aos encontrados em nosso trabalho também não foram suficientes para encontrar valores de associação estatisticamente significativos.

As mudanças epigenéticas no sangue periférico estão sendo amplamente estudadas com o objetivo de acompanhar o fenótipo e permitir a detecção inicial da lesão (Yang *et al.*, 2014). Entretanto, assinaturas gênicas a partir da metilação no sangue periférico em $p14^{ARF}$ nos tumores mamários são desconhecidas até o momento.

5.5 Metilação de $p16^{INK4a}$

A codificação da proteína p16 é resultado da ativação do promotor gênico antecedente aos três exons do gene *CDKN2A*. Assim como a proteína p14, é resultado do *splicing* alternativo do exon 1 α (Serrano *et al.*, 1993). Embora, compartilhem de exons em comum, a proteína p14 e p16 possuem promotores diferentes e associações de inibição diversas quando comparados dados da literatura.

As modificações de hipermetilação no promotor de $p16^{INK4a}$ e sua funcionalidade de silenciamento transcricional tem se tornado um dos principais eventos de inativação do gene que incluem vários tumores, dentre eles: câncer gástrico, pulmão, câncer colorretal, tireoide e carcinoma hepático (Elisei *et al.*, 1998; Gazzeri *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2003).

Somente 3/62 (4,8%) casos de lesões mamárias apresentaram hipermetilação para o promotor de $p16^{INK4a}$. Dentre estes, o diagnóstico histopatológico final foi de dois carcinomas invasivos, subtipos ductal puro e CDIS associado à mucinoso e o último determinado por CDIS puro. As idades de diagnóstico foram avançadas para o CDI e o CDIS puro. O outro caso, histopatológico mucinoso, embora de histologia rara, não apresentou fenótipo agressivo, uma vez que é esperado bom prognóstico quando a lesão é diagnosticada em estágio inicial. Nestes mesmos casos, quando avaliada a metilação de $p16^{INK4a}$ no DNA linfocitário e salivar, os resultados foram positivos. Entretanto, nenhuma variável apresentou associação significativa à hipermetilação no promotor do gene $p16^{INK4a}$.

A metilação de $p16^{INK4a}$ em lesões mamárias são variáveis entre os estudos. Apesar da hipometilação nas amostras avaliadas serem de fenótipo precoce e histopatológico misto quanto à malignidade, Dumitrescu *et al.*, (2010) contrariam nossos resultados, pois os autores detectaram a hipermetilação em lesões de estágio precoce e em tecidos saudáveis da mama. Ainda além, descreveram a associação por grupos étnicos, sendo $p16^{INK4a}$ hipermetilado com maior frequência em americanos-europeus (65%) do que em americanos-africanos (28%). Di Vinci *et al.*, (2004) também comparando as frequências de hipermetilação entre fibroadenomas, CDI e áreas de margem às lesões, verificaram que em 67/98 (68,4%) das amostras analisadas, a metilação do promotor de $p16^{INK4a}$ foi detectada. Estendendo a análise comparada para a marcação da proteína por imunistoquímica não encontraram qualquer associação. Os autores justificam que os resultados do trabalho e de demais da literatura podem estar intimamente alterados pelas técnicas utilizadas.

Em comparação com os achados de metilação do promotor de $p16^{INK4a}$ em amostras tumorais da mama, nosso trabalho apresenta uma taxa bastante dispersa em relação ao trabalho de Zhao *et al.*, (2010). Os autores verificaram uma positividade em 24% das amostras avaliadas. Askari *et al.*, (2013) detectaram hipermetilações em 22% dos CDI. Além do mais, esse último trabalho confirmou relações significativas entre a hipermetilação com a menarca ($>12 \leq 15$) e a idade (>50 anos) das mulheres.

Comparado a outros tumores, Kis *et al.*, (2014) encontraram hipermetilação em 9/29 (31%) tumores orais e em 5/21(24%) tumores escamosos da laringe. Roman-Gomez *et al.*, (2006) avaliando células de leucemia linfóide aguda encontraram em seu amostral hipermetilação em 35% dos casos, e Essel-Dulaimi *et al.*, (2004) em 7% dos tumores de bexiga avaliados.

Dentre os casos de metilação no sangue periférico foi verificada a positividade em 16/39 (41%) amostras, sendo 4/21 (19,4%) tumores benignos e 12/41(29,2%) tumores malignos. As variáveis clínicas-patológicas correlacionadas não apresentaram associações estatísticas significativas.

Embora os resultados encontrados não demonstrem associações, Vallian *et al.*, (2009) enfatizam a elaboração de testes a partir do sangue periférico e a sua possível associação de metilação em $p16^{INK4a}$ como tentativa de acompanhar a eficácia de terapias à base de inibidores da metilação no DNA.

Dentre a revisão da literatura não foram encontrados trabalhos que relacionem a metilação de $p16^{INK4a}$ no sangue periférico com o risco para o câncer de mama. Os principais trabalhos relatam a metilação do gene no DNA livre no plasma e soro. Sturgeon *et al.*, (2012) avaliando a metilação nos promotores dos genes supressores tumorais em amostras malignas, benignas da mama e suas possíveis associações de comprometimento linfonodal, os autores encontraram valores significativos da hipermetilação em $p16^{INK4a}$ principalmente nas amostras malignas e com comprometimento de linfonodo. Radpour *et al.*, (2010) avaliando a risco para câncer de mama em associação com a hipermetilação de DNA circulante, detectaram a sensibilidade de 50% e especificidade de 90% para a hipermetilação em $p16^{INK4a}$ nestes casos. Estendendo o trabalho, a frequência isolada de metilação para os tumores de estágio inicial em plasma foi de 59,2% e em soro 41,7%; para os tumores em estágio avançado, 22,2% em plasma e 37,5% em soro. Estes resultados contradizem aqueles que determinam a metilação de $p16^{INK4a}$ para tumorais avançados e de pior prognóstico. Jing *et al.*, (2008), encontraram uma taxa de metilação em 29% do amostral, sendo este fator associado aos níveis séricos

elevados de CA15.3 e o grau histológico dos tumores. Ainda mais, a metilação esteve associada ao risco relativo de 6 vezes para óbito.

Em estudos com tumores de ovário, Bammidi *et al.*, (2012) encontraram hipermetilação para $p16^{INK4a}$ no DNA circulante para 28/50 (56%) das amostras, sugerindo a alteração epigenética como marcador de diagnóstico e prognóstico a ser utilizado na clínica. Tan *et al.*, (2013) verificaram a associação de metilação para o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Os resultados apresentaram taxa significativa, porém não associada ao sexo, idade, histórico de hábito de fumar, grau, tipo histológico e estágio clínico da doença.

Em outros trabalhos que avaliaram a hipermetilação de DNA circulante como vigilante da associação com câncer e exposição à carcinógenos, Zhang *et al.*, (2014) detectaram a hipermetilação de $p16^{INK4a}$ em amostras de DNA circulante de agricultores de coca como fator de risco para desenvolvimento de câncer de pulmão. Os resultados confirmam a hipermetilação como fator de risco para o desenvolvimento tumoral. Ainda além, Broberg *et al.*, (2014) avaliaram a influência da exposição ao arsênico e o perfil de metilação do gene $p16^{INK4a}$, onde encontraram relações significativas entre os achados epigenéticos e o risco para desenvolvimento de neoplasias.

Assim como as avaliações de epigenética no gene $p14^{ARF}$, as avaliações com o gene $p16^{INK4a}$ estão sendo amplamente estudadas principalmente no DNA circulante. Porém, não existem trabalhos até o nosso conhecimento que tenham avaliado DNA de sangue periférico tendo como alvo o promotor do gene $p16^{INK4a}$ e sua possível relação com o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Os resultados encontrados despertam para a importância de avaliações mais detalhadas, justamente por existirem estratégias terapêuticas direcionadas as alterações epigenéticas no DNA tumoral.

5.6 Metilação de *ATM*

O gene *ATM* é responsável por codificar uma proteína de mesma nomenclatura com peso molecular de 350,6 kD. Integrante da família das quinases 3-fosfatidil inositol atua nas vias de reparo do DNA e controle do ciclo celular (Savitsky *et al.*, 1995). Resultado da ativação de seu promotor, esta região é compartilhada com o gene *NPAT*, porém de forma bidirecional e sua expressão controlada principalmente pela metilação das ilhas CpG (Byrd *et al.*, 1996).

As alterações epigenéticas no promotor do gene têm sido destacadas com frequências variáveis e responsável pela diminuição de expressão do gene em adenomas pré-neoplásicos (Rengucci *et al.*, 2014), carcinomas escamosos orais (Rigi-Ladiz *et al.*, 2011), carcinoma pulmonar de células não-pequenas (Do *et al.*, 2014), câncer de bexiga (Casadio *et al.*, 2013) e em tumores da mama (Watanabe *et al.*, 2013).

Dentre as lesões avaliadas, 33/62 (53,2%) apresentaram hipermetilação, sendo 7/21 (33,3%) lesões benignas e 26/41 (63,4%) malignas. Embora represente uma taxa significativa entre as lesões malignas, não houve qualquer associação significativa entre as variáveis clínico-patológicas e a malignidade do tumor. Estes dados são variáveis e em maioria consequentes da sensibilidade das técnicas utilizadas. Em conforme com nosso trabalho, Vo *et al.*, (2004) detectaram uma taxa de hipermetilação em 78% do seu amostral por *MSP-PCR* e utilizando dos mesmos iniciadores deste trabalho. Entretanto, Treilleux *et al.*, (2007) contradiz os resultados e destacam a ausência de metilação em carcinomas mamários invasivos.

Moelans *et al.*, (2011) a partir da técnica semi-quantitativa metilação-específica em ensaio multiplex (*MS-MLPA*) (Nygren *et al.*, 2005), detectaram hipermetilação em 12% dos tumores mamários invasivos. Watanabe *et al.*, (2013) por reação de pirosequenciamento, considerando a variável quimioterapia e resposta patológica completa, detectaram a presença de metilação modesta em 8/57 (14%) amostras mamárias analisadas. Destacando a quimioterapia como fator de risco, os autores enfatizam a tendência elevada de metilação em tumores triplo-negativos. Pal *et al.*, (2010) através da espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) detectaram a presença de metilação em 30/51 (59%) tumores de mama grau histológico 1 e 2, porém quando comparado a tecidos adjacentes não neoplásicos e variáveis clínico-patológicas não houve qualquer associação estatística significativa. Em comparação com este último trabalho, nossos achados confirmam a presença de alterações epigenéticas com maior frequência em tumores malignos de graus histológicos intermediários e com prognósticos mais favoráveis comparados aqueles de tumores triplo negativos.

Estendendo a procura de alterações epigenéticas para casos de metástases, no trabalho de Salhia *et al.*, (2014), os autores observaram que o gene *ATM* comumente aparece deletado e sub-expresso em metástases cerebrais. Quando avaliado o perfil deste amostral, foram observados níveis diminuídos de metilação para triplos negativos comparados aos subgrupos HER2+/ER- e luminal-B.

Entre os trabalhos de amostral tumoral que não de mama, os dados possuem taxas heterogêneas. Não há uma determinação de associação segura quanto ao papel da metilação

do gene *ATM* e o desenvolvimento da carcinogênese. No trabalho de Rigi-Ladiz *et al.*, (2011), carcinomas escamosos orais apresentaram uma taxa de metilação de 88,09%, porém quando comparados ao grupo controle, este apresentou taxas próximas de 77,19%. Conseqüentemente, não foi possível encontrar qualquer significância entre as variáveis clínico-patológicas do estudo. Ao contrário, Mielcarek-Kuchta *et al.*, (2014) avaliando 53 carcinomas orais e de orofaringe não encontraram qualquer achado de metilação. Em outro estudo, Do *et al.*, (2014) também não encontraram qualquer alteração de metilação em onze linhagens celulares de carcinoma de pulmão de células não pequenas.

Os casos positivos para metilação no sangue periférico foi verificada em 16/39 (26%) amostras, sendo 6/21 (28,7%) tumores benignos e 10/41 (24,4%) tumores malignos. As variáveis clínicas-patológicas correlacionadas não apresentaram associações estatísticas significativas. Embora não haja comprovação da influência clínica da metilação do gene *ATM* no sangue para a carcinogênese mamária, deve-se destacar a frequência representativa das alterações epigenéticas encontradas no DNA proveniente de células do sangue periférico (Flanagan *et al.*, 2009).

Os principais trabalhos que descrevem a associação da epigenética no gene *ATM* à carcinogênese são de pesquisa direta ao tecido tumoral mamário (Vo *et al.*, 2004). Dentre os estudos têm sido confirmado a hipótese de que a metilação aberrante em genes supressores na massa tumoral também possa ser encontrada no DNA tumoral circulante, e que as células linfocitárias possam estar intimamente associadas a estas alterações. A partir deste contexto, Cho *et al.*, (2010) destacam que as modificações nestas células possam assumir papéis de marcação precoce, sendo mais sensíveis e acessíveis para conduta do diagnóstico e prognóstico do câncer de mama. Nos trabalhos de Flanagan *et al.*, (2009) e Brennan *et al.*, (2009) os níveis de metilação em regiões intragênicas do gene *ATM* no sangue têm revelado fator de risco para a carcinogênese mamária. Entre as variáveis analisadas, a metilação esteve associada a mulheres mais jovens, em casos de câncer familiar e em cânceres mamários bilaterais.

Cho *et al.*, (2010) avaliando tecido tumoral mamário, margem de tumor e células provenientes do sangue periférico, encontraram associação entre a hipermetilação presente no tumor com a hipermetilação no sangue. Embora os autores não tenham avaliado o gene *ATM*, destacam o perfil de metilação dos genes *RASSF1A*, *H1N1* e *APC* com o tumor e o sangue. Além do mais, a hipermetilação no sangue apresentou risco para desenvolvimento de câncer de mama em 2 vezes, contudo quando aplicada a estatística de penetrância não houve associações significativas entre os casos avaliados.

Em demais estudos, pacientes com câncer de mama (Snell *et al.*, 2008) e próstata (Rouprêt *et al.*, 2010) apresentam perfil de metilação aumentado em genes supressores tumorais no sangue quando comparados com os controles. Estes trabalhos hipotetizam a contaminação do pellet linfocitário com células tumorais circulantes, sendo a técnica utilizada responsável pela detecção e sensibilidade da presença de metilação nestas células. Em contradição, demais avaliações do perfil de metilação do DNA linfocitário não revelou fator de risco para câncer colorretal (Lim *et al.*, 2008), bexiga (Moore *et al.*, 2008), cabeça e pescoço (Hsiung *et al.*, 2007)

Mesmo nos trabalhos que promovem a associação de metilação no gene *ATM* no sangue com a carcinogênese mamária (Brennan *et al.*, 2012), ainda não há dados suficientes e resultados ampliados para tal afirmação. Os resultados destes trabalhos sugerem possibilidades de utilização para rastreamento e determina como fator de risco para câncer de mama. Em acordo, nosso trabalho, quando comparado aos casos de benignidade e malignidade, os achados foram quase que equivalentes e variáveis clinico-patológicas não representaram peso na significância estatística. A ampliação do número amostral, além da investigação em grupos controles deve ser analisada.

5.7 Investigação da metilação de *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}* e *ATM* na saliva

Exames menos invasivos e agressivos favorecem a melhor aceitação para sua realização e contribui para que não haja relutância do paciente na necessidade de repetição do teste. É de grande interesse na clínica a descoberta de biomarcadores em fluidos que permitam evitar biópsias, coletas de sangue recorrentes e que torne o tratamento mais individualizado e seletivo. As vantagens do uso da saliva comparada ao sangue incluem economia de custo, menor risco de infecção pelo coletador, maior conveniência do paciente, aceitabilidade, conformidade e conforto (Abraham *et al.*, 2012).

Até alguns anos atrás, a saliva era considerada unicamente como fluido contribuinte para o sistema digestivo e como fator de estímulo para liberação de enzimas endógenas. Em decorrência dos estudos recentes, a saliva passou a ser considerada uma forte pretendente de busca por biomarcadores que possam revelar doenças locais, assim como doenças sistêmicas, por exemplo, as neoplasias (Burbelo *et al.*, 2012). A hipótese que a contempla como fonte promissora, está justamente nos vasos sanguíneos que infiltram as glândulas salivares e

seriam responsáveis pelo transporte de biomoléculas contidas no sangue e responsáveis por alterar o seu conjunto de biocomponentes (Drobitch *et al.*, 1992; Haeckel *et al.*, 1993, Burbelo *et al.*, 2012; Yoshizawa *et al.*, 2013).

A investigação de metilação no DNA salivar trata-se de um estudo-piloto. Não há na literatura estudos de perfil associativo para o risco de câncer de mama. As principais dificuldades em analisar e utilizar a saliva como prática de rastreamento epigenético estão na integridade do material genético, pois este se apresenta bastante fragmentado e está sujeito a contaminação por bactérias e células em processo apoptótico da mucosa oral (Yoshizawa *et al.*, 2013).

Dentre os resultados de metilação na saliva, o gene $p14^{ARF}$ apresentou metilado em 1/41 (2,4%) caso para tumor maligno, sendo este CDI. Para o gene $p16^{INK4a}$ foi detectada metilação em 1/21 (4,8%) lesão benigna (HA) e em 5/41 (12%) tumores malignos. Estes casos foram variáveis, sendo todos de histopatológico infiltrativo, variável somente quanto à miscigenação de massas tumorais *in situ*, em destaque, para o tipo histológico mucinoso. Para o gene ATM foi detectada a metilação em 4/21 (19,04%) tumores benignos e em 4/41 (9,75%) tumores malignos. As lesões benignas variaram entre HA e fibroadenoma, e os tumores malignos em CDIS e CDI. As variáveis clinico-patológicas analisadas não apresentaram qualquer tipo de associação significativa.

Os perfis de metilação na saliva são bem destacados nos resultados de Liu *et al.*, (2010) e Thompson *et al.*, (2013), onde demonstram similariedade de metilação na saliva e no sangue. Embora, os estudos utilizem de técnicas de microarranjos, voltados para detecção em larga escala, a taxa diminuída de metilação encontrada em nosso trabalho provavelmente esteve associada à qualidade do material obtido e a técnica de detecção utilizada. Em consideração, Wu *et al.*, (2013) investigando o perfil epigenético em regiões intragênicas encontrou uma taxa diminuída para a saliva comparada ao sangue.

Ovchinnikov *et al.*, (2012) determinam a saliva como alvo de estudo ideal para neoplasias da cavidade oral, justamente por ser o fluido de contato à cavidade e tecidos adjacentes. Os autores demonstram que a metilação do promotor do gene de $p16^{INK4a}$ esteve associada ao risco para desenvolvimento de cânceres de células escamosas da cabeça e pescoço e principalmente aqueles envolvidos aos casos de fumantes. Em carcinoma escamoso de células orais, Nagata *et al.*, (2012) encontraram relação associativa com a metilação de $p16^{INK4a}$ na saliva. Entre os casos avaliados, os autores detectaram metilação em 21/34 (62%) carcinomas orais, e conseqüentemente, o teste revelou taxa de sensibilidade de 38,2% e especificidade de 91,7%. Em outro trabalho, Guerrero-Preston *et al.*, (2012) detalham o perfil

de metilação dos genes *HOXA2* e *NID2* na saliva relacionado ao histopatológico dos carcinomas orais e de orofaringe. Os autores encontraram associação de risco e sugerem a iniciativa de trabalhos experimentais em larga escala, na possibilidade de utilizar a saliva como biomarcador para tumores de cavidades orais. Além destes, o perfil de metilação em genes para câncer de mama esteve diminuído na saliva de indivíduos mais aptos fisicamente e que se exercitavam mais minutos por semana (Bryan *et al.*, 2013).

As avaliações utilizando da saliva como alvo promissor para descoberta de novos marcadores ainda é questão de estudo. Os trabalhos recentes detalham dificuldades, porém enaltecem a possibilidade de novas descobertas, em especial para as proteínas que possam estar alteradas nos casos de neoplasias da mama. O trabalho de Zhang *et al.*, (2010) é considerado o primeiro estudo de desenho experimental detalhado e demonstrativo de validação de oito mRNAs e uma proteína específica na saliva, a anidrase carbônica VI, em pacientes com câncer de mama. Os achados demonstraram sensibilidade de taxa de 83% e especificidade de 97%. Entretanto, os autores enfatizam a validação em amostrais ampliados e destacam a necessidade de provas em tumores diversos.

O perfil proteômico da saliva tem se tornado o principal alvo de pesquisa e caminha para uma margem de maior detalhe em tumores mamários. Já é sabido que o fluxo salivar é diminuído em mulheres com carcinomas infiltrativos em crescimento (Napeñas *et al.*, 2013), e que o perfil proteômico da saliva de mulheres com tumores mamários HER2+ (Streckfus *et al.*, 2012) é diferencial em comparação com o grupo HER2- e também em mulheres saudáveis. Ainda mais, este perfil se estende para casos de carcinomas ductais com e sem comprometimento linfonodal (Streckfus *et al.*, 2009). Consequentemente, acreditamos fielmente que este é um de vários caminhos possíveis de elucidação dos tumores mamários a partir da saliva. O estudo epigenético a partir deste material representa uma ferramenta promissora e provável como alternativa para rastreamento e diagnóstico precoce da carcinogênese mamária.

CONCLUSÃO

- a) Nenhuma mutação somática foi encontrada nas 62 amostras mamárias impalpáveis BI RADS 3 e 4 para os genes *TP53* (exons 4-9) e *CDKN2A* (exon 1-3);
- b) Os resultados das alterações epigenéticas são relevantes quando encontrados em fluidos biológicos (sangue, saliva) que não a lesão mamária;
- c) Os achados despertam a necessidade de refinamento na investigação e sugerem que as modificações moleculares aqui encontradas possam atuar como candidatas a biomarcadores circulantes para lesões mamárias iniciais e pré-neoplásicas.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:417-26.
- Abraham JE, Maranian MJ, Spiteri I, Russell R, Ingle S, Luccarini C, et al. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Med Genomics.* 2012;5:19.
- Adepoju LJ, Chun J, El-Tamer M, Ditkoff BA, Schnabel F, Joseph KA. The value of clinical characteristics and breast-imaging studies in predicting a histopathologic diagnosis of cancer or high-risk lesion in patients with spontaneous nipple discharge. *Am J Surg.* 2005;190:644-6.
- Allred DC. Pathology and biological features of premalignant breast disease. *Diseases of the breast.* 4ª edição. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2010. 321-332.
- Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, Mohsin SK, O'Connell P, Tsimelzon A, Medina D. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res.* 2008;15:370-8.
- Amos CI, Wang LE, Lee JE, Gershenwald JE, Chen WV, Amos CI, et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Human Mol Genet.* 2011;15(20):5012-23.
- Andergassen U, Hofmann S, Kölbl AC, Schindlbeck C, Neugebauer J, Hutter S, et al. Detection of tumor Cell-Specific mRNA in the Peripheral Blood of patients with breast cancer – Evaluation of several markers with Real-Time Reverse Transcription - PCR. *Int J Mol Sci.* 2013;14:1093-104.
- Angele S, Hall J. The *ATM* gene and breast cancer: is it really a risk factor? *Mutat Res.* 2000;462:167-78.
- Antequera F, Bird A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol.* 1999;9:661–67.
- Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, et al. Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer.* 2012;130:2568-79.
- Ashutosh N, Virendra K, Attri PC, Arati S. Giant male fibroadenoma: a rare benign lesion. *Indian J Surg.* 2013;75:353-5.
- Askari M, Sobti RC, Nikbakht M, Sharma SC. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes (p14/ARF and p16/INK4a): case-control study in North Indian population. *Mol Biol Rep.* 2013;40:4921-28.

Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, et al. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179:572–8.

Badal V, Menendez S, Coomber D, Lane DP. Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation. *Cell Cycle*. 2008;7:112–119.

Badra FA, Karamouzis MV, Ravazoula P, Likati-Karatza E, Tzorakoleftherakis E, Koukouras D, et al. Non-palpable breast carcinomas: Correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and epidermal growth factor receptor (EGFR) family expression. *Cancer Letters*. 2006;244:34-41.

Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J, Srivastava A, Prashad R, Gupta SD, et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients. *Life Sci*. 2008;82:1288–1292.

Bai X, Zhang E, Ye H, Nandakumar V, Wang Z, Chen L, et al. PIK3CA and TP53 gene mutations in human breast cancer tumors frequently detected by ion torrent DNasequencing. *PLoS One*. 2014;9:e99306.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2013;421:499-506.

Balabram D, Turra CM, Gobbi H. Survival of patients with operable breast cancer (Stages I-III) at a Brazilian public hospital-a closer look into cause-specific mortality. *BMC Cancer*. 2013;24:13:34.

Bammidi LS, Neerukonda GN, Murthy S, Kanapuram RD. p16 gene alterations in human ovarian cancers: comparison between tissue and blood samples. *Int J Gynecol Cancer*. 2012; 22:553-60.

Barekati Z, Radpour R, Lu Q, Bitzer J, Zheng H, Toniolo P, et al. Methylation signature of lymph node metastases in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;13:12:244.

Barlow WE. Performance of diagnostic mammography for women with signs or symptoms of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;27:2600-08.

Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, Mohammed S, Hodgson S, Bobrow LG, et al. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet*. 1992; 1:259-63.

Beam CA, Conant EF, Sickles EA. Association of volume and volume-independent factors with accuracy in screening mammogram interpretation. *J Natl Cancer Inst*. 2003;19:282-90.

Bohn OL, Fuertes-Camilo M, Navarro L, Saldivar J, Sanchez-Sosa S. p16INK4a expression in basal-like breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;30:600-7.

Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, et al. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic

(p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:75-84.

Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Måsbäck A, et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1260–66.

Bouchet BP, Fromental CC, Puisieux A, Galmarini CM. p53 as a target for anti cancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2006;58:190–207.

Broberg K, Ahmed S, Engström K, Hossain MB, Jurkovic Mlakar S, Bottai M, et al. Arsenic exposure in early pregnancy alters genome-wide DNA methylation in cord blood, particularly in boys. *J Dev Orig Health Dis.* 2014;5:288-98.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:701-13.

Brennan EP, Ehrich M, Brazil DP, Crean JK, Murphy M, Sadlier DM, et al. Comparative analysis of DNA methylation profiles in peripheral blood leukocytes versus lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics.* 2009;4:159–64.

Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, Jones M, Ashworth A, Swerdlow A, et al. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* 2012;72:2304–13.

Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte. A Promoter methylation and the detection of breast cancer. *Cancer Causes Control.* 2009;20:1539-50.

Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM. p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1284–92.

Bryan AD, Magnan RE, Caldwell Hooper AE, Harlaar N, Hutchison KE. Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. *Ann Behav Med.* 2013;45:89–98.

Burbelo PD, Bayat A, Lebovitz EE, Iadarola MJ. New Technologies for studying the complexity of oral diseases. *Oral Dis.* 2012;18:121–26.

Burnside ES, Sickles EA, Bassett LW, Rubin DL, Lee CH, Ikeda DM, et al. The ACR BI-RADS experience: learning from history. *J Am Coll Radiol.* 2009;12:851-60.

Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant tumors of the breast . In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* 9^o edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 374-407.

Byrd PJ, Cooper PR, Stankovic T, Kullar HS, Watts GD, Robinson PJ, Taylor MR. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:1785–91.

Caldon CE. Estrogen signaling and the DNA damage response in hormone dependent breast cancers. *Front Oncol.* 2014;14(4):106. eCollection 2014.

Cardiff RD, Wellings SR. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1999;4:105–122.

Casadio V, Molinari C, Calistri D, Tebaldi M, Gunelli R, Serra L, et al. DNA Methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer: an MS-MLP approach. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;19:94.

Chala LF e Barros N. Avaliação das mamas com métodos de imagem [editorial]. *Radiol Bras,* 2007. 40:4–6.

Chlebowski RT, Col N, Winer EP, Collyar DE, Cummings SR, Vogel VG 3rd, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment of pharmacologic interventions for breast cancer risk reduction including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition. *J Clin Oncol.* 2002;20:3328-43.

Choi EJ, Yun JA, Jeon EK, Won HS, Ko YH, Kim SY. Prognostic significance of RSP01, WNT1, P16, WT1, and SDC1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:314.

Cho YH, Yazici H, Wu HC, Terry MB, Gonzalez EK, Qu M, et al. Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2010;30:2489-96.

Christensen BC, Kelsey KT, Zheng S, Houseman EA, Marsit CJ, Wrensch MR, et al. Breast cancer DNA methylation profiles are associated with tumor size and alcohol and folate intake. *PLoS Genet.* 2010; 6:e1001043.

Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Polish Journal of Endocrinology* 2010;61:126-34.

Debra HJ. Complexities and subtleties in the measurement and reporting of breastfeeding practices. *Int Breastfeed.* 2011;5:6-17.

Debniak T, Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. CDKN2A-positive breast cancers in young women from Poland. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103:355-59.

del Cura JL, Elizagaray E, Zabala R, Legórburu A, Grande D. The use of unenhanced Doppler sonography in the evaluation of solid breast lesions. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;184:1788-94.

Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, et al. p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *Int J Cancer.* 2004; 10:414-21.

Dieci MV, Piacentini F, Dominici M, Omarini C, Goubar A, Ficarra G, et al. Quantitative Expression of Estrogen Receptor on Relapse Biopsy for ER-positive Breast Cancer: Prognostic Impact. *Anticancer Res.* 2014;34:3657-62.

Dillon DA, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 4^o edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 374-407.

Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* 2005;7:171-9.

Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2003;9:423–26.

Do H, Wong NC, Murone C, John T, Solomon B, Mitchell PL, et al. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma. *Sci Rep.* 2014;26:4186.

Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. P53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst.* 2001;2;700-4.

Drobitch RK, Svensson CK. Therapeutic drug monitoring in saliva: an update. *Clin. Pharmacokinet.* 1992;23:365–79.

Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espi M, et al. The H. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int. J. Cancer.* 2012;9.

Dumitrescu RG, Marian C, Krishnan SS, Spear SL, Kallakury BV, Perry DJ, et al. Familial and racial determinants of tumour suppressor genes promoter hypermethylation in breast tissues from healthy women. *J Cell Mol Med.* 2010;14:1468–75.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;12:R6.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007;447:1087-93.

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

Elisei R, Shiohara M, Koeffler HP, Fagin JA. Genetic and epigenetic alternations of the cyclin-dependent kinase inhibitors p15 INK4b and p16INK4a in human thyroid carcinoma cell lines and primary thyroid carcinomas. *Cancer.* 1998; 83:2185–93.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 2000;59:67–70.

- Essel Dulaimi I, Robert G, Uzzo I, Richard E, Greenberg I, Tahseen A-S, et al. Detection of bladder cancer in urine by tumour suppressor gene hyper methylation panel. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1887–93.
- Feki A, Irminger-Finger I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;52:103-116.
- Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R57.
- Filho GB, Pereira FEL, Guimaraes RC. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In: Bogliolo, L. *Patologia Geral.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 226-281.
- Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet.* 2009;1:1332-42.
- Folgueira MAAK, Brentani MM. Câncer de mama. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular.* 2º edição. Rio de Janeiro: Atheneu; 2010. 135-144.
- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature.* 1988;336:577-80.
- Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene.* 1998;16:497–504.
- Goldstein AM, Stacey SN, Olafsson JH, Jonsson GF, Helgason A, Sulem P, et al. *CDKN2A* mutations and melanoma risk in the Icelandic population. *J Med Gen.* 2008;45:248-9.
- Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010;7:1334-41.
- Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A et al. Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus9p21-22 in sporadic invasive breast carcinomas. *Mol Med.*1998;4:807–22.
- Guerrero-Preston R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-López L, Macía-Colón G, et al. NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissues and saliva. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4:1061-72.
- Haeckel R, Hanecke P. The application of saliva, sweat, and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann. Biol. Clin.* 1993.51:903–910.
- Hainaut P. TP53 tumor suppressor gene: 20 years (and ten thousand mutations) later. *Bull Cancer.* 2000;87:11-8.

Harinck F, Kluijt I, van der Stoep N, Oldenburg RA, Wagner A, Aalfs CM, et al. Indication for CDKN2A-mutation analysis in familial pancreatic cancer families without melanomas. *J Med Genet.* 2012;49:362-65.

Heimann R, Hellman S. Clinical progression of breast cancer malignant behavior; what to expect and when to expect it. *J. Clin. Oncol.* 2000;18:591-99.

Helvie MA. Imagin analysis: Mammography. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 4^o edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 116-130.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. 3;9821-6.

Heywang-Köbrunner SH, Schreer I, Heindel W, Katalinic A. Imaging studies for the early detection of breast cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 2008;105:541-7.

Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, Chew K, Baylin SB, Herman JG, et al. Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res.* 2003;1:1596-601.

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

Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, et al. Global DNA methylation level in whole blood as biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:108-14.

Huillarda E, Hashizume R, Phillips JJ, Griveau A, Ihrie RA, Aokic Y, et al. Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy. *PNAS.* 2012;29:8710–15.

Hultborn KA, Iarsson LG, Ragnhult I. The lymph drainage from the breast to the axillary and parasternal lymph nodes, studied with the aid of colloidal Au198. *Acta radiol.* 1955;4:52-64.

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

Iacobucci I, Ferrari A, Lonetti A, Papayannidis C, Paoloni F, Trino S, et al. CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7413-23.

IARC – International Agency for Research on Cancer [Internet] [acesso em 2012 out 30] Disponível em: <http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>

IARC – International Agency for Research on Cancer [Internet] [acesso em 2014 out 1] Disponível em: <http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>

Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, et al. Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41:614–22.

Jing F, Jun L, Yong Z, Wang Y, Fei X, Zhang J, et al. Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker. *Oncology.* 2008; 75:60-6.

Jones PA, Michels KB. Epigenetics of cancer. In: De Kita, Hellman and Roseberg's. *Cancer:Principles & Practice of Oncology.* 9º edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 374-407.

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

Kamb A, Gruis NA, Weaver-feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.*1994;264:436-40.

Khouri NF. Breast Ultrasound. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 4º edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 131-151.

Kis A, Tatár TZ, Gáll T, Boda R, Tar I, Major T, et al. Frequency of Genetic and Epigenetic Alterations of p14ARF and p16INK4A in Head and Neck Cancer in a Hungarian Population. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:923-9.

Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27,825 patient evaluations. *Radiology.* 2002;225:165–75.

Jensen EV, Desombre ER, Kawashina T, Suzuki T, Kyser K, Jungblut PW. Estrogen-binding substances of target tissues. *Science.* 1967;158:529-30.

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

Jorns JM, Healy P, Zhao L. Review of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2/neu immunohistochemistry impacts on treatment for a small subset of breast cancer patients transferring care to another institution. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1660-63.

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

Jung EJ, Kim IS, Lee EY, Kang JE, Lee SM, Kim DC, et al. Comparison of methylation profiling in cancerous and their corresponding normal tissues from korean patients with breast cancer. *Ann Lab Med.* 2013;33:431-40.

Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11:3604-08.

Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-za-29-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2013;5:3.

Karamouziz MV, Likaki-Karatza E, Ravazoula P, Badra FA, Koukouras D, Tzorakoleftthekearis E, et al. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and molecular prognostic factors. *Int. J. Cancer*, 2002;102:86-90.

Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:790–96.

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

Lee JJ, Ko E, Cho J, Park HY, Lee JE, Nam SJ, et al. Methylation and Immunoexpression of p16(INK4a) tumor suppressor gene in primary breast cancer tissue and their quantitative p16(ink4a) hypermethylation in plasma by real-time PCR. *Korean J Pathol*. 2012;46:554-61.

Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*. 2006;125:301–13.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2006. 121:2750–67.

Leopoldino DD, D'ippolito G, Bezerra ASA, Gracio TS. Aspectos técnicos da ressonância magnética de mama com meio de contraste: revisão de literatura. *Radiol Bras*. 2005;38:287-94.

Lester SC. A mama. In: Robbins and Cotran. *Pathologic basis of disease*. 8º edição. São Paulo: Elsevier; 2010. 374-407.

Li J, Jye M, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor p16ink4a and their relevance to cancer. *Biochemistry*. 2011;50:5566–82.

Li S, Hursting SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;983:161-9.

Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett*. 2006;237:272-80.

- Liedke PE, Finkelstein DM, Szymonifka J, Barrios CH, Chavarri-Guerra Y, Bines J, et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:126-33.
- Lim U, Flood A, Choi SW, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, et al. Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology.* 2008;134:47-55.
- Liu J, Morgan M, Hutchison K, Calhoun VD. A study of the influence of sex on genome wide methylation. *PLoS ONE.* 2010;5:e10028.
- Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2008;9:1879-902.
- Ma S, Liu X, Jiao B, Yang Y, Liu X. Low-dose radiation-induced responses: focusing on epigenetic regulation. *Int J Radiat Biol.* 2010;86:517-28
- Mardis ER. Genome sequencing and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012;22:245-50.
- Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J, Seget M, Kiwerska K, Biczysko W, Szyfter K, et al. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. *Tumour Biol.* 2014;35:7441-9.
- MS - Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA) [Internet] [acesso em 2014 mar 12] Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama).
- MS - Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA) [Internet] [acesso em 2014 set 14] Disponível em : http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama+.
- Mendez A, Cabanillas F, Echenique M, Perez MI, Ramos E. Mammographic features and correlation with biopsy findings using 11-gauge stereotatic vacuum-assisted breast biopsy (SVABB). *Ann. Oncol.* 2004;15:450-54.
- Menezes GL, Knuttel FM, Stehouwer BL, Pijnappel RM, van den Bosch MA. Magnetic resonance imaging in breast cancer: A literature review and future perspectives. *World J Clin Oncol.* 2014;5:61-70.
- Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, Gulben K. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast.* 2008;17:341-46.
- Moelans CB, Verschuur-Maes AHJ, Van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J. Pathol.* 2011;225:222-31.
- Moffat DF, Going JJ. Three dimensional anatomy of complete duct systems in human breast: pathological and developmental implications. *J Clin Pathol.* 1996;49:48-52.

- Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2008;9:359-66.
- Moriya T, Silverberg SG. Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ) of the breast. A comparison of pure noninvasive tumors with those including different proportions of infiltrating carcinoma. *Cancer.* 1994;1:2972-8.
- Morrel D, Cromartie E, Swift M. Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst.* 1986;77:89-92.
- Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, et al. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2012;118:4298-308.
- Napeñas JJ, Miles L, Guajardo-Streckfus C, Streckfus CF. Salivary flow rates among women diagnosed with benign and malignant tumors. *Spec Care Dentist.* 2013;33:102-10.
- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MSMLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;16:e128.
- Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;15:1157-67.
- Osborne MP, Boolbol SK. Breast Anatomy and Development. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 4^o edição. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2010:374-407.
- Ottesen GL, Graversen HP, Blichert-Toft M, Christensen IJ, Andersen JA. Carcinoma in situ of the female breast. 10 year follow-up results of a prospective nationwide study. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;62:197-210.
- Ovchinnikov DA, Cooper MA, Pandit P, Coman WB, Cooper-White JJ, Keith P, et al. Tumor-suppressor gene promoter hypermethylation in saliva of head and neck cancer patients. *Transl Oncol.* 2012;5:321-6.
- Qureshi MA, Jan N, Dar NA, Hussain M, Andrabi KI. A novel p16(INK4A) mutation associated with esophageal squamous cell carcinoma in a high risk population. *Biomarkers.* 2012;17:552-6.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:2817-26.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:3726-34.

- Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N, et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer*. 2010;23:9:303.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol*. 2009;27:1160-67
- Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest*. 2008;26:1-10.
- Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;21:R5.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92:713-23.
- Quadros L. Classificação BI RADS[®] para laudos de mamografia. *Rev Bras Mast*. 2003;13:147.
- Radisky DC, Santisteban M, Berman HK, Gauthier ML, Frost MH, Reynolds CA, et al. p16(INK4a) expression and breast cancer risk in women with atypical hyperplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4:1953-60.
- Radpour R, Barekati Z, Haghighi MM, Kohler C, Asadollahi R, et al. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010;23:763-72.
- Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res*. 2010;20:434-9.
- Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, et al. Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nat Genet*. 1995;10:114-6.
- Rengucci C, De Maio G, Gardini AC, Zucca M, Scarpi E, Zingaretti C, et al. Promoter methylation of tumor suppressor genes in pre-neoplastic lesions; potential marker of disease recurrence. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2014;33:65
- Rigi-Ladiz MA, Kordi-Tamandani DM, Torkamanzehi A. Analysis of hypermethylation and expression profiles of APC and ATM genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2011;1:3-6.
- Robertson KD, Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and downregulated by wild-type p53. *Mol. Cell. Biol*. 1998;18:6457-73.

Robertson L, Armstrong GN, Olver BD, Lloyd AL, Shete S, Lau C, et al. Survey of familial glioma and role of germline *p16INK4A/p14ARF* and *p53* mutation. *Fam Cancer*. 2010;9:413–421.

Rocco JW, Sidransky D: p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2001;264:42-55.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Garate L, et al. Promoter hyper methylation and global hypo methylation are independent epigenetic events in lymphoid leukemogenesis with opposing effects on clinical outcome. *Leukemia*. 2006; 20:1445–144.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE ,et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673–84.

Roubidoux MA, Bailey JE, Wray LA, Helvie MA. Invasive cancers detected after breast cancer screening yielded a negative result: relationship of mammographic density to tumor prognostic factors. *Radiology*. 2004;230,42-48.

Rouprêt M, Hupertan V, Catto JW, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer*. 2008;122:952–56.

Saarenmaa I, Salminen T, Geiger U, Heikkinen P, Hyvärinen S, Isola J, et al. The effect of age and density of the breast on the sensitivity of breast cancer diagnostic by mammography and ultrasonography. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;67:117–23.

Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:414–20.

Salem DS, Kamal RM, Mansour SM, Salah LA, Wessam R. Breast imaging in the young the role of magnetic resonance imaging in breast cancer screening diagnosis and follow up. *J Thorac Dis*. 2013;5:9-18.

Salhia B, Kiefer J, Ross JTD, Metapally R, Martinez RA, N KJ, et al. Integrated Genomic and Epigenomic Analysis of Breast Cancer Brain Metastasis. *Plos One*. 2014;9:e85448.

Sambrook J, Fritsch EF, TManiatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977;74:5463-67.

Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, ZivY, Sartiel A, Collins FS, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet*. 1995;4:2025-32.

- Schelfout K, Van Goethem M, Kersschot E, Colpaert C, Schelfhout AM, Leyman P, et al. Contrast-enhanced MR imaging of breast lesions and effect on treatment. *Eur J Surg Oncol.* 2004;30:501-07.
- Schmitt F, Gobbi H. Mama. In: Brasileiro-Filho G. Bogliolo Patologia. 4º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991: 617.
- Schmitt F, Gobbi H. Mama. In: Brasileiro-Filho G. Bogliolo Patologia. 7º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006: 617.
- Schnitt SJ, Collins LC. Pathology of benign breast disorders. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 4º edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 69-85.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366:704-07.
- Shan M, Zhang X, Liu X, Qin Y, Liu T, Liu Y, et al. P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer. *PLoS One.* 2013; 11:e76408.
- Sharma G, Mirza S, Prasad CP, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. *Life Sci.* 2007;80:1873-81.
- Sherr CH. The INK4a/ARF network in tumor suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:731-37.
- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14ARF, p15INK4B and p16INK4A Genes is a Frequent Event in Human Oral Squamous Cell Carcinomas. *Oral Oncol.* 2001;37:498-04.
- Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, et al. Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:1070-80.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science.* 1987;235:177-82.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones L, et al. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244:707-12.
- Smith RA. The evolving role of MRI in the detection and evaluation of breast cancer. *New Engl J Med.* 2007;357:1362-64.
- Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R12.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10869–74.

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

Soussi T, Bérout C. Assessing *TP53* status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews*. 2001;9:223-240.

Spellman PT, Heiser L, Gray JW. Breast Cancer Genomics. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast*. 4^o edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 010. 363-73.

Stankovic T, Milinkovic V, Bankovic J, Dinic J, Tanic N, Dramicanin T, et al. Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non small cell lungcarcinoma, glioma and breast carcinoma samples. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68:521-6.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. The alternative product from the human *CDKN2A* locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO Journal*. 1998;17:5001–14.

Streckfus CF, Arreola D, Edwards C, Bigler L. Salivary protein profiles among HER2/neu-receptor-positive and -negative breast cancer patients: Support for using salivary protein profiles for modeling breast cancer progression. *J Oncol*. 2012;413256.

Streckfus CF, Storthz KA, Bigler L, Dubinsky WP. A comparison of the proteomic expression in pooled saliva specimens from individuals diagnosed with ductal carcinoma of the breast with and without lymph node involvement. *J Oncol*. 2009;737619.

Stredrick DL, Garcia-Closas M, Pineda MA, Bhatti P, Alexander BH, Doody MM, et al. The ATM missense mutation p.ser49cys (c.146C-G) and the risk of breast cancer. *Hum. Mutat*. 2006;27:538-44.

Sturgeon SR, Balasubramanian R, Schairer C, Muss HB, Ziegler RG, Arcaro KF. Detection_of_promoter_methylation_of_tumor_suppressor_genes_in_serum_DNA_of_breast_cancer_cases_and_benign_breast_disease_controls. *Epigenetics*. 2012;7:1258-67.

Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*. 1991;325:1831-36.

Tan S, Sun C, Wei X, Li Y, Wu Y, Yan Z, et al. Quantitative assessment of lung cancer associated with genes methylation in the peripheral blood. *Exp Lung Res*. 2013; 39:182-90.

Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, et al. p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10:138.

Tao MH, Marian C, Nie J, Ambrosone C, Krishnan SS, Edge SB, et al. Body mass and DNA promoter methylation in breast tumors in the Western New York exposures and breast cancer study. *Am J Clin Nutri.* 2011;94:831-38.

Tejerina BA, Tejerina BA, Rabadán DF, De Lara GA, Roselló LJA, Tejerina GA. Breast imaging: how we manage diagnostic technology at a multidisciplinary breast center. *J Oncol.* 2012;213421.

Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, et al. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res.* 2010; 20:440-6.

Thompson TM, Sharfi D, Lee M, Yrigollen CM, Naumova OY, Grigorenko EL. Comparison of whole-genome DNA methylation patterns in whole blood, saliva, and lymphoblastoid cell lines. *Behav Genet.* 2013;43:168-76.

Tlsty TD, Crawford YG, Holst CR, Fordyce CA, Zhang J, McDermott K, et al. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9:263-74.

Tommiska J, Bartkova J, Heinonen M, Hautala L, Kilpivaara O, Eerola H, et al. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2008;27:2501-6.

Treilleux I, Chapot B, Goddard S, Pisani P, Angele S, Hall J. The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathol.* 2007;51:63-9.

Vallian S, Sedaghat M, Nassiri I, Frazmand A. Methylation status of p16 INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer. *Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:991-96.

van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, et al. NEU-protein overexpression in breast cancer: association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *New Eng. J. Med.* 1988;319:1239-45.

Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:659-72.

Vineis P, Chuang SC, Vaissiere T, Cuenin C, Ricceri F, Johansson M, et al. DNAmethylation changes associated with cancer risk factors and blood levels of vitamin metabolites in a prospective study. *Epigenetics.* 2011;6:195-201.

Vo QN, Kim WJ, Cvitanovic L, Boudreau DA, Ginzinger DG, Brown KD. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene.* 2004;23:9432-7.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:275-83.

Walker GJ, Hussussian CJ, Flores JF, Glendening JM, Haluska FG, Dracopoli NC, et al. Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in Australian melanoma kindreds. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1845-52.

Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. *J Pathol.* 1991;165:203-11.

Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, et al. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes Cells.* 2013;18:1120-30.

Weinberg WC, Brown PD, Steller-Stevenson WG, Yuspa SH. Modulation of hair follicle cell proliferation and collagenolytic activity by specific growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 642: 281-90.

Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.* 2010;220:263- 80.

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1975;55:231-73.

Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene.* 2002;21:5462-482.

Willet CW, Tamini RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA. Nongenetic factors in the causation of breast cancer. . In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast.* 4^o edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 248-90.

Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S, et al. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1991;63:447-50.

Wu HC, Wang Q, Chung WK, Andrulis IL, Daly MB, John EM, et al. Correlation of DNA methylation levels in blood and saliva DNA in young girls of the LEGACY Girls study. *Epigenetics.* 2014;9:929-33.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillet E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 1998;2:305-16.

Yang D, Torres CM, Bardhan K, Zimmerman M, McGaha TL, Li K. Decitabine and vorinostat cooperate to sensitize colon carcinoma cells to Fas ligand-induced apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo. *J Immunol.* 2012;188:4441-49.

Yang-Feng TL, Schechter AL, Weinberg RA, Francke U. Oncogene from rat neuro/glioblastomas (human gene symbol NGL) is located on the proximal long arm of human chromosome 17 and EGFR is confirmed at 7p13-q11.2. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 1985;40:784.

Yang R, Pfützte K, Zucknick M, Sutter C, Wappenschmidt B, Marme F, et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer-associated HYAL2 methylation in peripheral blood. *Int J Cancer*. 2014 Sep 12. [Epub ahead of print].

Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat. Rev. Genet*. 2012;13:795-06.

Ye C, Cai Q, Dai Q, Shu XO, Shin A, Gao YT, et al. Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer*. 2007;109:1729-35.

Youn I, Kim MJ, Moon HJ, Kim EK. Absence of residual microcalcifications in atypical ductal hyperplasia diagnosed via stereotactic vacuum-assisted breast biopsy: in surgical excision obviated? *J_Breast Cancer*. 2014;17:265-9.

Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:781-91.

Zhang J, Pickering CR, Holst CR, Gauthier ML, Tlsty TD. p16^{INK4a} modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2006;1;66:10325-31.

Zhang H, Li X, Ge L, Yang J, Sun J, Niu Q. Methylation of CpG island of p14(ARK), p15(INK4b) and p16(INK4a) genes in coke oven workers. *Hum Exp Toxicol*. 2014;16. [Epub ahead of print].

Zhang L, Xiao H, Karlan S, Zhou H, Gross J, Elashoff D, et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One*. 2010;31:5:e15573.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998; 92:725–34.

Zhao L, Yang X, Khan A, Kandil D. Diagnostic role of immunohistochemistry in the evaluation of breast pathology specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138:16-24.

Zhao YF, Shen SP, Jiang JY, Geng H, Guo JG, Xie LP. Methylation and expression of gene p16INK4a and RB in breast carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2010;39:377–81.

Zhou W, Muggerud AA, Vu P, Due EU, Sørli T, Børresen-Dale AL, et al. Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution. *Mol Oncol*. 2009; 3:214-9.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****PESQUISA DAS LESÕES IMPALPÁVEIS (LESÕES III E IV), E DAS ALTERAÇÕES EM TP53 (p53) NA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DE MAMA.**

Nome da Paciente: _____

Número da Matrícula: _____

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa da qual serão coletadas amostras da lesão e de sangue e secreção salivar para análise do TP53 (p53), **CDKN2A (p16)**, **ATM**, expressão de marcadores HER2, receptores hormonais (estrogênios e progesteronas) que serão importantes para fatores diagnósticos e prognósticos.

Este projeto tem como coordenadora a Dra. Gilda Alves Brown, Bióloga, Pesquisadora do Laboratório de Genética Aplicada do Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Para que você possa decidir se quer participar ou não desta pesquisa, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DA PESQUISA

A detecção precoce do câncer de mama aumenta consideravelmente as chances de cura.

A interpretação das lesões impalpáveis (III e IV) em imagens de mama, a partir de técnicas de processamento de imagens, é ainda objeto de pesquisa. A associação de estudo criterioso dessas imagens com um importante marcador molecular de câncer de mama não familiar, os genes supressores tumorais TP53 (p53), CDKN2A (p16), ATM, poderá tornar o exame de diagnóstico inicial ou de acompanhamento pós-tratamento mais confiável.

As imagens serão geradas por mamógrafos de alta resolução e/ou digital associando-se à ultra sonografia de alta frequência e morfometria matemática. A análise dos genes TP53, CDKN2A (p16), ATM será feita através de PCR-SSCP, seguido de sequenciamento de DNA para detecção das mutações, e as deleções serão analisadas através da técnica de Perda de Heterozigosidade (LOH).

PROCEDIMENTO DA PESQUISA

Se a senhora concordar em participar desta pesquisa, uma amostra de sangue (5 mililitros ou o correspondente a uma colher de sobremesa), uma amostra da lesão e uma amostra de saliva (2 mililitros), serão utilizadas nesta pesquisa. Essas amostras serão enviadas para o Laboratório de Genética Aplicada do INCA para a análise das mutações do TP53 (p53), CDKN2A (p16), ATM por PCR-SSCP, sequenciamento de DNA e a LOH, além da análise de expressão do HER2 pelo método de ELISA.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não há métodos alternativos para a sua participação nesta pesquisa. Se a senhora não concordar com os procedimentos descritos, não poderá participar da mesma.

RISCOS

A coleta de sangue pode resultar em dor no local da punção ou mancha roxa transitória no local, chamada de equimose. Caso isso venha ocorrer, a senhora será orientada a como tratá-la.

BENEFÍCIOS

Esta pesquisa pode não trazer melhora para a sua saúde, entretanto as informações obtidas nesta pesquisa podem contribuir para futura melhora na precisão do diagnóstico precoce do câncer de mama, aumentando as chances de cura.

ACOMPANHAMENTO – ASSISTÊNCIAS - RESPONSÁVEIS

O seu acompanhamento durante o procedimento será feito pela Dra. Carolina Maria de Azevedo. A responsável pelo processamento e armazenamento das mostras será a Dra. Gilda Alves Brown.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará da senhora, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do INCA, do HUGG e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizados para propósitos educativos ou de publicação científica, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação desta pesquisa.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo ou forma de pagamento para a senhora pela participação nesta pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que a senhora saiba que a sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária e que a senhora pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidade ou perdas de benefícios as quais a senhora tem direito. Em caso de decidir interromper a sua participação nesta pesquisa, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos à esta pesquisa será imediatamente interrompida, os dados obtidos de suas amostras não serão utilizados.

O médico responsável pelo procedimento pode interromper a sua participação nesta pesquisa a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização, por razões justificadas que lhe serão explicadas.

O seu tratamento, caso não queira participar desta pesquisa, não será alterado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a senhora ou aos seus familiares a fazer perguntas sobre a pesquisa, a qualquer momento. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Gilda Brown no telefone 2506-6622 ou para o CEP do INCA no telefone 3233-1410.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito desta pesquisa, assim como os benefícios e riscos potenciais da participação da mesma. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar desta pesquisa.

Entendo que poderei ser submetida, a um exame de sangue adicional ao necessário para meu acompanhamento e que não receberei compensação monetária por minha participação nesta pesquisa.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.


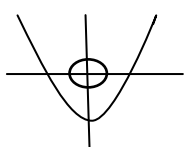
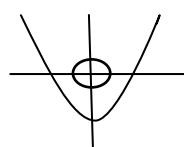
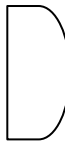
_____/_____. _____ / _____
 (Assinatura da Paciente) dia mês ano

 (Nome da paciente – Letra de forma)

_____/_____. _____ / _____
 (Assinatura de testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa à paciente indicada acima e/ou a pessoa autorizada para consentir pela paciente.

_____/_____. _____ / _____
 (Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

DADOS PESSOAIS						
DATA	NOME					PRONTUÁRIO 118
IDADE	DATA DE NASCIMENTO	SEXO	COR	ESTADO CIVIL	PROFISSÃO	
ENDEREÇO				TELEFONE		
				E-MAIL		
DADOS CLÍNICOS						
QUEIXA PRINCIPAL						
EVOLUÇÃO						
MENARCA		MENOPAUSA		NORMAL <input type="checkbox"/>		
GESTA		HISTERECTOMIA <input type="checkbox"/>				
PARA		DATA DE NASCIMENTO DO 1º FILHO ____/____/____				
ABORTO		ALEITAMENTO <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO DURAÇÃO _____				
HISTÓRICO FAMILIAR						
MÃE _____ IDADE	AVÓ _____ IDADE	FILHA _____ IDADE				
IRMÃ _____ IDADE	TIA _____ IDADE					
TERAPIA HORMONAL						
TEMPO _____						
CAUSA: HISTERECTOMIA <input type="checkbox"/> OSTEOPOROSE <input type="checkbox"/> MENOPAUSA <input type="checkbox"/> OUTROS <input type="checkbox"/> -						
EXAMES POR IMAGEM REALIZADOS						
MAMOGRAFIA <input type="checkbox"/> US <input type="checkbox"/> OUTROS <input type="checkbox"/>						
TIPO DE LESÃO IMPALPÁVEL						
DISTORÇÕES ARQUITETURAIS <input type="checkbox"/> DENSIDADE FOCAL <input type="checkbox"/> NÓDULO INFRA CENTIMÉTRICO (REDONDO OU OVAL) <input type="checkbox"/>						
MICROCALCIFICAÇÕES <input type="checkbox"/>						
TIPOS (BI-RADS):						
III	IV	V	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LOCALIZAÇÃO DA LESÃO						
QSE	QSI	<input type="checkbox"/>				
QIE	QII	<input type="checkbox"/>				
TIPOS DE BIÓPSIA						
CIRÚRGICA <input type="checkbox"/> GUIADA POR US <input type="checkbox"/> LOCALIZAÇÃO ESTEREOTÁXICA <input type="checkbox"/>						
MARCADORES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> R						
RESULTADO HISTOPATOLÓGICO						

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética – INCA

Aprovação do Comitê de Ética – INCA



Memo 094/08-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de março de 2008

A(o): Dr(a). Gilda Alves Brown
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP n° 109/07 (Este n°. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "A importância das lesões impalpáveis (lesões III e IV), e das alterações em TP53 (p53) na detecção precoce do câncer de mama"

Prezada Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise aprovou o Protocolo intitulado: **Importância das lesões impalpáveis (lesões III e IV), e das alterações em TP53 (p53) na detecção precoce do câncer de mama, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 2) em 10 de março de 2008.**

Ressaltamos que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: setembro/2008 e março/2009.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dra Jane Dobbin – Chefe do Serviço de Hematologia – HC I

ANEXO C – Aprovação do comitê de ética em pesquisa HUGG

Aprovação do comitê de ética em pesquisa HUGG


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MEMO CEP-HUGG / N° 80/ 2012

Rio de Janeiro, 11 de setembro de 2012.

A
Ilma. Carolina Maria de Azevedo
Pesquisador Responsável

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em reunião realizada em 11 de setembro de 2012, a Emenda 01 de 18/07/12, entregue ao CEP em 27/08/12 referente ao projeto "Detecção Precoce do Câncer de Mama – Estudo da efusão mamilar através do diagnóstico por imagem (mamografia e ultrassonografia), exame citológico e bases moleculares registrado no CEP-HUGG sob o n° 07/2007 foi analisada, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96, e considerado **APROVADA**.

Resaltamos que todo envio de documentação e comunicação entre pesquisador e CEP-HUGG deverá ser formalizada através de memorando numerado, datado e assinado pelo pesquisador responsável, sempre discriminando o número do projeto registrado no CEP-HUGG, bem como o seu título no SISNEP.

Informamos que, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96, cabe ao pesquisador apresentar os relatórios parciais (semestrais) e final do projeto aprovado, observando os critérios estabelecidos pela CONEP e pelo CEP-HUGG.


Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro Eder Portari Filho
Coordenador do CEP-HUGG

ANEXO D – Avaliação estatística de $p14^{ARF}$

Análise estatística de $p14^{ARF}$

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar a variável metilação (lesão, sangue, saliva e sangue ou saliva) no gene $p14^{ARF}$ com as variáveis de interesse (idade, idade da menopausa, malignidade, etilismo, tabagismo e histórico familiar de câncer). O teste *qui-quadrado de Fisher* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico SPSS, versão 17. Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

Tabela 1 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p14^{ARF}$ na lesão e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Lesão		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	51	1	1,000
		%	87,9%	100,0%	
	Sim	N	7	0	
		%	12,1%	,0%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	37	0	0,315
		%	69,8%	,0%	
	Sim	N	16	1	
		%	30,2%	100,0%	
Malignidade	Não	N	22	0	1,000
		%	36,1%	,0%	
	Sim	N	39	1	
		%	63,9%	100,0%	
Etilismo	Não	N	38	1	1,000
		%	73,1%	100,0%	
	Sim	N	14	0	
		%	26,9%	,0%	
Tabagismo	Não	N	37	1	1,000
		%	71,2%	100,0%	
	Sim	N	15	0	
		%	28,8%	,0%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	27	0	0,481
		%	52,9%	,0%	

	Sim	N	24	1
		%	47,1%	100,0%
Total			58	1
			100,0%	100,0%

Tabela 2 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p14^{ARF}$ no sangue e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Sangue		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	25	9	1,000
		%	86,2%	90,0%	
	Sim	N	4	1	
		%	13,8%	10,0%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	17	8	0,688
		%	65,4%	80,0%	
	Sim	N	9	2	
		%	34,6%	20,0%	
Malignidade	Não	N	14	2	0,265
		%	45,2%	20,0%	
	Sim	N	17	8	
		%	54,8%	80,0%	
Etilismo	Não	N	19	8	1,000
		%	76,0%	80,0%	
	Sim	N	6	2	
		%	24,0%	20,0%	
Tabagismo	Não	N	18	7	1,000
		%	72,0%	70,0%	
	Sim	N	7	3	
		%	28,0%	30,0%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	15	4	0,700
		%	57,7%	44,4%	
	Sim	N	11	5	
		%	42,3%	55,6%	
Total			29	10	
			100,0%	100,0%	

Tabela 3 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p14^{ARF}$ na saliva e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Sangue ou Saliva		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	25	9	1,000
		%	86,2%	90,0%	
	Sim	N	4	1	
		%	13,8%	10,0%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	17	8	0,688
		%	65,4%	80,0%	
	Sim	N	9	2	
		%	34,6%	20,0%	
Malignidade	Não	N	14	2	0,265
		%	45,2%	20,0%	
	Sim	N	17	8	
		%	54,8%	80,0%	
Etilismo	Não	N	19	8	1,000
		%	76,0%	80,0%	
	Sim	N	6	2	
		%	24,0%	20,0%	
Tabagismo	Não	N	18	7	1,000
		%	72,0%	70,0%	
	Sim	N	7	3	
		%	28,0%	30,0%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	15	4	0,700
		%	57,7%	44,4%	
	Sim	N	11	5	
		%	42,3%	55,6%	
Total			26	9	
			100,0%	100,0%	

ANEXO E - Análise estatística de $p16^{INK4a}$

Análise estatística de $p16^{INK4a}$

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar a variável metilação (lesão, sangue, saliva e sangue ou saliva) no gene $p16^{INK4a}$ com as variáveis de interesse (idade, idade da menopausa, malignidade, etilismo, tabagismo e histórico familiar de câncer). O teste *qui-quadrado de Fisher* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico SPSS, versão 17. Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

Tabela 1 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p16^{INK4a}$ na lesão e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Lesão		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	49	3	1,000
		%	87,5%	100,0%	
	Sim	N	7	0	
		%	12,5%	,0%	
Menopausa ≤50 (anos)	Não	N	36	1	0,230
		%	70,6%	33,3%	
	Sim	N	15	2	
		%	29,4%	66,7%	
Malignidade	Não	N	22	0	0,546
		%	37,3%	,0%	
	Sim	N	37	3	
		%	62,7%	100,0%	
Etilismo	Não	N	37	2	1,000
		%	74,0%	66,7%	
	Sim	N	13	1	
		%	26,0%	33,3%	
Tabagismo	Não	N	35	3	0,550
		%	70,0%	100,0%	
	Sim	N	15	0	
		%	30,0%	,0%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	26	1	0,603

	Sim	%	53,1%	33,3%
		N	23	2
		%	46,9%	66,7%
Total			56	3
			100,0%	100,0%

Tabela 2 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p16^{INK4a}$ no sangue e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Sangue		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	19	14	1,000
		%	86,4%	87,5%	
	Sim	N	3	2	
		%	13,6%	12,5%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	13	12	0,458
		%	65,0%	80,0%	
	Sim	N	7	3	
		%	35,0%	20,0%	
Malignidade	Não	N	10	6	1,000
		%	41,7%	37,5%	
	Sim	N	14	10	
		%	58,3%	62,5%	
Etilismo	Não	N	17	10	,410
		%	85,0%	71,4%	
	Sim	N	3	4	
		%	15,0%	28,6%	
Tabagismo	Não	N	14	11	,704
		%	70,0%	78,6%	
	Sim	N	6	3	
		%	30,0%	21,4%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	11	7	1,000
		%	52,4%	53,8%	
	Sim	N	10	6	
		%	47,6%	46,2%	
Total			22	16	
			100,0%	100,0%	

Tabela 3 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p16^{INK4a}$ na saliva e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Saliva		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	4	6	
		%	100,0%	100,0%	
	Sim	N			
		%			
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	4	4	0,467
		%	100,0%	66,7%	
	Sim	N	0	2	
		%	,0%	33,3%	
Malignidade	Não	N	2	1	0,500
		%	50,0%	16,7%	
	Sim	N	2	5	
		%	50,0%	83,3%	
Etilismo	Não	N	2	4	1,000
		%	50,0%	66,7%	
	Sim	N	2	2	
		%	50,0%	33,3%	
Tabagismo	Não	N	3	5	1,000
		%	75,0%	83,3%	
	Sim	N	1	1	
		%	25,0%	16,7%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	3	2	0,524
		%	75,0%	40,0%	
	Sim	N	1	3	
		%	25,0%	60,0%	
Total			4	6	
			100,0%	100,0%	

Tabela 4 - Qui-quadrado da associação entre metilação de $p16^{INK4a}$ no sangue ou saliva e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Sangue ou Saliva		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	19	14	1,000
		%	86,4%	87,5%	
	Sim	N	3	2	
		%	13,6%	12,5%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	13	12	0,458
		%	65,0%	80,0%	
	Sim	N	7	3	
		%	35,0%	20,0%	
Malignidade	Não	N	10	6	1,000
		%	41,7%	37,5%	
	Sim	N	14	10	
		%			

		%	58,3%	62,5%	
Etilismo	Não	N	17	10	0,410
		%	85,0%	71,4%	
	Sim	N	3	4	
		%	15,0%	28,6%	
Tabagismo	Não	N	14	11	0,704
		%	70,0%	78,6%	
	Sim	N	6	3	
		%	30,0%	21,4%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	11	7	1,000
		%	52,4%	53,8%	
	Sim	N	10	6	
		%	47,6%	46,2%	
Total			22	16	
			100,0%	100,0%	

ANEXO F - Análise estatística de *ATM*

Análise estatística de *ATM*

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar a variável metilação (lesão, sangue, saliva e sangue ou saliva) no gene *ATM* com as variáveis de interesse (idade, idade da menopausa, malignidade, etilismo, tabagismo e histórico familiar de câncer). O teste *qui-quadrado de Fisher* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico SPSS, versão 17. Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

Tabela 1 - Qui-quadrado da associação entre metilação de *ATM* na lesão e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Lesão		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	27	25	0,106
		%	96,4%	80,6%	
	Sim	N	1	6	
		%	3,6%	19,4%	
Menopausa ≤50 (anos)	Não	N	19	18	0,380
		%	76,0%	62,1%	
	Sim	N	6	11	
		%	24,0%	37,9%	
Malignidade	Não	N	11	11	0,793
		%	37,9%	33,3%	
	Sim	N	18	22	
		%	62,1%	66,7%	
Etilismo	Não	N	19	20	0,535
		%	79,2%	69,0%	
	Sim	N	5	9	
		%	20,8%	31,0%	
Tabagismo	Não	N	17	21	1,000
		%	70,8%	72,4%	
	Sim	N	7	8	
		%	29,2%	27,6%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	12	15	0,785

		%	54,5%	50,0%
	Sim	N	10	15
		%	45,5%	50,0%
Total			29	31
			100,0%	100,0%

Tabela 2 - Qui-quadrado da associação entre metilação de *ATM* no sangue e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Sangue		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	20	14	1,000
		%	87,0%	87,5%	
	Sim	N	3	2	
		%	13,0%	12,5%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	13	13	0,142
		%	61,9%	86,7%	
	Sim	N	8	2	
		%	38,1%	13,3%	
Malignidade	Não	N	10	7	1,000
		%	40,0%	43,8%	
	Sim	N	15	9	
		%	60,0%	56,3%	
Etilismo	Não	N	18	10	0,401
		%	85,7%	71,4%	
	Sim	N	3	4	
		%	14,3%	28,6%	
Tabagismo	Não	N	14	12	0,262
		%	66,7%	85,7%	
	Sim	N	7	2	
		%	33,3%	14,3%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	11	7	1,000
		%	50,0%	53,8%	
	Sim	N	11	6	
		%	50,0%	46,2%	
Total			22	13	
			100,0%	100,0%	

Tabela 3 - Qui-quadrado da associação entre metilação de *ATM* na saliva e as variáveis de interesse

Variável			Metilação Saliva		P-valor
			não	sim	
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	8	6	0,467
		%	100,0%	85,7%	

	Sim	N	0	1	
		%	,0%	14,3%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	6	5	1,000
		%	75,0%	71,4%	
	Sim	N	2	2	
		%	25,0%	28,6%	
Malignidade	Não	N	3	4	1,000
		%	37,5%	50,0%	
	Sim	N	5	4	
		%	62,5%	50,0%	
Etilismo	Não	N	7	4	0,282
		%	87,5%	57,1%	
	Sim	N	1	3	
		%	12,5%	42,9%	
Tabagismo	Não	N	7	5	0,569
		%	87,5%	71,4%	
	Sim	N	1	2	
		%	12,5%	28,6%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	5	3	0,315
		%	71,4%	37,5%	
	Sim	N	2	5	
		%	28,6%	62,5%	
Total			8	7	
			100,0%	100,0%	

Tabela 4 - Qui-quadrado da associação entre metilação de *ATM* na saliva ou sangue e as variáveis de interesse

Variável	Metilação Sangue ou Saliva		P-valor		
	não	sim			
Idade (anos) ≤ 40	Não	N	18	16	1,000
		%	85,7%	88,9%	
	Sim	N	3	2	
		%	14,3%	11,1%	
Menopausa ≤ 50 (anos)	Não	N	11	15	,065
		%	57,9%	88,2%	
	Sim	N	8	2	
		%	42,1%	11,8%	
Malignidade	Não	N	8	9	,537
		%	36,4%	47,4%	
	Sim	N	14	10	
		%	63,6%	52,6%	
Etilismo	Não	N	17	11	,207
		%	89,5%	68,8%	
	Sim	N	2	5	
		%	10,5%	31,3%	
Tabagismo	Não	N	13	13	,460

		%	68,4%	81,3%	
	Sim	N	6	3	
		%	31,6%	18,8%	
HF de câncer de mama/ovário/próstata	Não	N	10	8	1,000
		%	52,6%	50,0%	
	Sim	N	9	8	
		%	47,4%	50,0%	
Total			19	16	
			100,0%	100,0%	

ANEXO G - Aceite da 1º publicação de artigo científico

Aceite da 1º publicação de artigo científico



Rio de Janeiro, 24 de junho de 2013

Prezados autores,

É com grande satisfação que, em nome da Revista Brasileira de Cancerologia (RBC), comunicamos que seu manuscrito MS 33-13 “Detecção dos Polimorfismos 213^{A→G} e 13494^{G→A} no Gene *TP53* em Carcinoma Ductal *in situ* de Mama – Relato de Caso”, foi **aceito** para publicação na RBC **59-3** (trimestre agosto/julho/setembro 2013).

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Luis Roberto Carrara'.

Editor Científico
Revista Brasileira de Cancerologia

Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica
R. Marquês de Pombal, 125
20230-240 – Rio de Janeiro – RJ
Telefone: 3207-6009 – e-mail: rbc@inca.gov.br

ANEXO H – Artigo 1

Artigo 1

Detecção dos Polimorfismos 213^{A→G} e 13494^{G→A} no Gene *TP53* em Carcinoma

Ductal *in situ* de Mama – Relato de Caso

Detection of Polymorphisms 213^{A→G} and 13494^{G→A} in the *TP53* Gene in Breast *in situ* Ductal
Carcinoma- Case Report

La detección de Polimorfismos 213^{A→G} y 13494^{G→A} en el Gen *TP53* en Carcinoma Ductal *in situ*
de Mama - Reporte de un Caso

Polimorfismos no Gene *TP53*

Lucas Delmonico¹; Lívia Menezes¹; Marco Felipe Franco Rosa², Najla Marques de Oliveira
Mattar², Eliane Barbosa Esteves¹, Vivian Rabello Areias¹, Carolina Maria de Azevedo², Gilda
Alves¹

Todos os autores participaram da concepção, planejamento da pesquisa, obtenção, análise,
interpretação de dados, redação e revisão crítica do artigo.

Patrocinador ou financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ -
102.558/2012, FAPERJ - APQ1 E-26/110.319/2008 e APQ1 E-26/110.803/2009).

Declaração de Conflito de Interesses: Nada a declarar

¹ Biomédico. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer – INCA. E-mail: lucasdelmonico@gmail.com. Rio de Janeiro (RJ), Brasil

¹ Graduanda em Ciências Biológicas –Bacharel – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer – INCA. E-mail: liviademenezes@yahoo.com.br. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

² Graduando em Medicina - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO . Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. E-mail: marcofelipe20@hotmail.com. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

² Graduanda em Medicina - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO. Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. E-mail: najla.mattar@yahoo.com.br. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

¹ Bióloga. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer – INCA. E-mail: elianebesteves@yahoo.com.br. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

¹ Biomédica. Mestre em Biociências Nucleares, pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Laboratório de Genética Aplicada/Serviço de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer – INCA. E-mail: vrareias@gmail.com. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

² Médica. Doutora em Radiologia, PhD, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Departamento de Radiologia/Hospital Universitário Gaffrée Guinle. E-mail: azevedocma@bol.com.br. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

¹ Bióloga. Doutora em Biofísica, PhD, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Laboratório de Genética Aplicada/Departamento de Hematologia/Instituto Nacional de Câncer – INCA. E-mail: gbrown@inca.gov.br. Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

Endereço para correspondência: Praça da Cruz Vermelha, 23, Instituto Nacional do Câncer, Laboratório de Genética Aplicada -6º andar, Centro, Rio de Janeiro (RJ), Brasil. CEP 20230-130. E-mail: gbrown@inca.gov.br.

Resumo

Introdução: A caracterização das alterações moleculares em lesões mamárias suspeitas para malignidade ainda não são bem definidas. Sabe-se que a detecção precoce do câncer de mama aumenta consideravelmente as chances de cura. Com isso, a busca por marcadores tumorais a fim de auxiliar no diagnóstico precoce e prever com confiança se estas lesões são benignas, ou malignas se faz necessária. No processo de carcinogênese diversas são as alterações de expressão gênica, na qual envolve vários genes chaves que controlam o ciclo celular. Dentre os genes, o *TP53* tem sido amplamente pesquisado por apresentar mutações e variantes que podem estar envolvidos na carcinogênese mamária. **Relato de caso:** Paciente do sexo feminino, 45 anos, branca, casada, residente do estado do Rio de Janeiro com Carcinoma Ductal *in situ* grau 2, multifocal. Lesão positiva para os receptores hormonais de estrogênio e progesterona, com ausência de mutação somática e com presença dos variantes 213^{A→G} e 13494^{G→A} no exon 6 e intron 6 do gene *TP53*. **Conclusão:** Embora tenham sido considerados, individualmente, neutros, não existem estudos que tenham avaliado o efeito sinérgico dos variantes 213^{A→G} e 13494^{G→A}.

Palavras-chaves: mama, lesões impalpáveis, *TP53*, polimorfismos, detecção precoce

Abstract

Introduction: The characterization of molecular alterations in breast lesions suspicious for malignancy is not well defined. It is known that early detection of breast cancer greatly increases the chances of cure. Thus, the search for tumor markers to aid in the early diagnosis and predict with confidence whether these lesions are benign or malignant is required. In the process of carcinogenesis are several changes in gene expression, which involves several key genes that control the cell cycle. Among the genes, *TP53* has been widely researched to have mutations and variations that may be involved in breast carcinogenesis. **Case report:** A female patient, aged 45, white, married, resident of the state of Rio de Janeiro with *in situ* Carcinoma Ductal, grade 2, multifocal. Injury positive for hormone estrogen and progesterone receptors, with no somatic mutation and presence of variants 213^{A→G} and 13494^{G→A} in exon 6 and intron 6 of *TP53*. **Conclusion:** Although considered individually neutral, the synergistic effect of 213^{A→G} and 13494^{G→A} variants is still unknown.

Key words: breast, non-palpable lesions, *TP53*, polymorphisms, early detection

Resumen

Introducción: La caracterización de las alteraciones moleculares en las lesiones sospechosas de malignidad no están bien definidos. Se sabe que la detección temprana de cáncer de mama aumenta en gran medida las posibilidades de curación. Por lo tanto, se requiere la búsqueda de marcadores tumorales para ayudar en el diagnóstico precoz y predecir con certeza si estas lesiones son benignas o malignas. En el proceso de la carcinogénesis son varios cambios en la expresión génica, lo que implica varios genes clave que controlan el ciclo celular. Entre los genes *TP53* ha sido ampliamente investigado tener mutaciones y variaciones que pueden estar implicados en la carcinogénesis de mama. **Caso clínico:** Paciente de sexo femenino, 45 años, blanco, casado, residente en el estado de Rio de Janeiro con carcinoma ductal in situ de grado 2, multifocal. Lesión positivo para receptores de hormonas estrógeno y progesterona, sin mutación somática y la presencia de variantes 213^{A→G} y 13494^{G→A} en el exón 6 y el intrón 6 de *TP53*. **Conclusión:** A pesar de que se han considerado de forma individual, neutral, no hay estudios que hayan evaluado el efecto sinérgico de variantes 213^{A→G} y 13494^{G→A}. *Palabras clave:* pecho, lesiones no palpables, *TP53* polimorfismos, la detección temprana

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a principal causa de morte entre as mulheres, com uma estimativa de risco para 2012/2013 de 52 casos por cada 100.000 mulheres no Brasil¹.

A busca por marcadores tumorais vem sendo amplamente pesquisados como forma de aperfeiçoar a detecção e aprimorar o tratamento. Contudo, a grande dificuldade da clínica é determinar com segurança quais os marcadores moleculares já descritos no câncer de mama seriam capazes de prever com confiança a detecção destas lesões que em muitas vezes, podem ser benignas.

Baseado nestes dados, o gene *TP53* amplamente estudado nas neoplasias mamárias é considerado um forte fator de prognóstico e apresenta flutuações nas taxas de mutação que podem alcançar a 25%². Ainda assim, pode sofrer variação quanto as sub-classificações histológicas e moleculares³.

Dentre os genes que contém diversas mutações variantes (*missense*), o gene *TP53* é capaz de gerar uma série de proteínas p53 mutantes, com níveis de atividade variáveis⁴. Em base, o genoma humano possui como um todo cerca de 3,1 milhões de variações de sequências, denominadas polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Dentre os validados para o gene *TP53*, alguns parecem remeter alguma alteração funcional a proteína e desencadear o processo de carcinogênese^{5,6,7}.

Inicialmente descrito por Carbone *et al.*⁸ em tumores de pulmão e mama, o variante A→C é resultado de um troca de base no codon 213, na região do exon 6, porém que não modifica a codificação da proteína p53. Inicialmente foi descrito pelo autor como fator de susceptibilidade a carcinogênese, porém logo sua descoberta, a hipótese foi contestada com diversos estudos que descreveram nenhuma associação de risco⁹⁻¹⁰.

O variante 13494^{G→A} foi inicialmente descrito através da fragmentação de uma região do intron 6 de 107 pares de base (pb) em bandas de 63 pb e 44 pb pela enzima de restrição MspI, resultado de uma troca de base no nucleotídeo 1394¹¹⁻¹²⁻¹³.

Os polimorfismos, 213^{A→G} e 13494^{G→A}, são validados pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) e podem ser acessados pelo banco de dados <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. São considerados polimorfismos neutros, logo, não promovem alteração funcional da proteína p53.

Relatamos um caso de paciente com Carcinoma Ductal *in situ* Grau 2, multifocal com achado molecular destes dois polimorfismos para o gene *TP53*.

DESCRIÇÃO DO CASO

Anamnese

A participação da paciente foi realizada pela autorização e assinatura da mesma no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A pesquisa possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) – Rio de Janeiro (RJ) – 07/2007. Paciente do sexo feminino, 45 anos, parda, casada, profissional do lar, residente do estado do Rio de Janeiro. Histórico de menarca aos 10 anos de idade, duas gestações, sem histórico de aborto e período de amamentação de dois anos e oito meses. Usuária de contraceptivo oral dos 16 aos 26 anos e dos 28 a 37 anos. Laqueadura no ano de 2001, com interrupção do uso do contraceptivo. Negou terapia hormonal e declarou-se ser etilista e tabagista. Relato de câncer na família, hepático e intestinal, tio e avó paterna, respectivamente.

Diagnóstico – Pré-operatório

Mama direita e mama esquerda sem nódulos palpáveis, com fluido mamilar de média intensidade, periareolar e inframamária, com períodos súbitos de evasão. Paciente relatou quadro clínico com persistência de dois meses, dezembro de 2010 a janeiro de 2011. Negou uso de medicamentos locais.

Mamografia revelou revestimento cutâneo e complexo areolopapilar sem alterações. Predomínio de tecido adiposo com ausência de nódulos. Detecção de microcalcificações agrupadas no quadrante superior externo da mama direita (MD). Ausência de comprometimento linfonodal axilar. Conclusão mamográfica final: mamas predominantemente adiposas, MD com lesão BI-RADS 4.

Biópsia excisional da MD revelou Carcinoma intraductal de alto grau em três ductos, com presença de microcalcificações e necrose central do tipo comedocarcinoma em um ducto. A avaliação imunoistoquímica foi positiva para estrogênio e progesterona em mais de 75% da lesão mamária, com ausência de imunoistoquímica para HER-2.

Diagnóstico – Pós-operatório

Macroscopia – segmento mamário de MD medindo 13,5x10,5x2,5 cm. Corte untuoso, lobulado e amarelado, com traves brancacentas e áreas pardacentas de permeio. Microscopia revelou Carcinoma Ductal *in situ* grau 2, multifocal. Padrão cribriforme, sólido e micropapilar, além de microcalcificações e focos de necrose intraluminal. Presença de áreas

de hiperplasia ductal atípica e hiperplasia ductal usual. Presença de alterações fibrocísticas no restante do parênquima mamário e margens cirúrgicas livres.

Avaliação molecular

A extração do DNA da lesão foi feita de acordo com Sambrook *et al.*, 1989¹⁴. Para amplificar os fragmentos de interesse do gene *TP53* foram utilizadas na solução base: 59 µL de água ultra-pura e estéril; 20 µL de tampão STR 10X (Invitrogen™); 8 µL de dNTPs (2 mM) (Invitrogen™); 6 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen™); 3,0 µL de cada iniciador (fragmento 1: F-tgttcactgtgccctgact; R- agcaatcagtgaggaaatcag; fragmento 2: F-tgggtgccaggggtccccag, R-cggagggccactgacaacca; fragmento 3: F- cttgccacaggtctcccaa, R-aggggtcagaggcaagcaga; fragmento 4: F- ttgggagtagatggagccct, R-agaggcaaggaaaggtgata) concentrados a 10 pmol/µL; 1 µL da enzima DNA polimerase (1 U/µL) (Invitrogen™) e 50-100ng/ µL de DNA genômico.

No termociclador *PTC-100™ Programable Thermal Controller*, a amplificação dos fragmentos foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 2 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE) e posteriormente sequenciados pelo método automático¹⁵. A análise não revelou mutações somáticas que compreendem a região codificante do exon 5 ao 8. Por outro lado, foi detectada a presença de dois variantes (SNPs) no exon 6 (figura 1) e intron 6 (figura 2). A análise do sequenciamento foi feita comparando-se a sequência referência do gene *TP53* utilizado pelo IARC e podendo ser acessado pelo *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) NC_000017-9. Essa comparação foi feita através dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* e *Sequencher Demo Version* da *Gene Codes*.

DISCUSSÃO

Cerca de 90% dos polimorfismos em *TP53* ocorrem nas sequências não codificantes. Até o momento, o único variante intrônico que parece estar relacionado ao risco de câncer é uma inserção de 16 pares de bases (pb) no intron 3 do gene *TP53*^{16,17}. Já dentro a região codificante, o polimorfismo no codon 72 (G412C), localizado no exon 4, é associado à alterações no processamento do mRNA, e parece ser um dos únicos que consequentemente eleva o risco para a carcinogênese¹⁸. Contudo, o variante G412C, parece não estar envolvido somente a fatores de risco¹⁸, mas por outro lado, responsável pela proteção de defeitos no tubo neural¹⁹.

Estudos sobre os polimorfismos 213^{A→G} e 13494^{G→A} são raros e eles apresentam baixa frequência⁴. Além disso, poucos são os casos descritos na população brasileira e que tenham relação à influência destes no processo de susceptibilidade ao câncer de mama²⁰⁻²¹.

Mazars et al.²² encontrou uma frequência de 3% para o polimorfismo 213^{A→G} em casos de câncer de ovário na população francesa e 2,6% para o grupo controle. Ainda assim, estendendo o trabalho para casos de câncer de mama e o seu envolvimento hereditário, não encontrou associação de risco. Pilger et al.²¹ estudando casos de patologias do esôfago na região sul do Brasil e a associação de ambos polimorfismos, não encontrou diferença de frequência entre caso e controle. Em outro trabalho, Simão *et al.*²⁰ estudando um amostral brasileiro de casos de câncer de mama no estado do Rio de Janeiro, um caso apresentou o polimorfismo 213^{A→G}.

O caso relatado aqui merece destaque por apresentar duas regiões de polimorfismos pouco frequentes em diferentes regiões do gene *TP53*, sendo uma região com característica homozigota (variante 213^{A→G}). Além deste fator, a paciente apresenta idade relativamente jovem para diagnóstico de câncer, sendo que dentre os fatores de risco para a maioria dos cânceres, a idade avançada é sem dúvida um dos fatores de risco mais discutido, pois o indivíduo provavelmente ao longo dos anos de vida vem acumulando mutações. A paciente se declara etilista e tabagista, sabe-se que ambos são fatores evitáveis, sendo o álcool responsável por alterar os níveis circulantes de estrogênio, elevando-se a susceptibilidade para a carcinogênese. Tais fatores podem estar envolvidos até então pela carcinogênese mamária na idade jovem.

Contudo, não se sabe ao certo a que ponto os variantes possam ser considerados neutros quando expressos em um mesmo gene. Não existem estudos que tenham detalhado o efeito sinérgico destes polimorfismos e qual poderia ser a influência de ambos na iniciação e

evolução da carcinogênese mamária. Dessa forma, a confirmação de influência destes variantes seria possível somente em estudos populacionais.

CONCLUSÃO

O caso relatado apresentou dois polimorfismos raros no gene *TP53*. Os SNPs 213^{A→G} e 13494^{G→A} embora descritos como variantes neutros, podem sugerir alguma influência de susceptibilidade para a carcinogênese mamária, por isso deve ser feito o *follow up* da paciente atenciosamente.

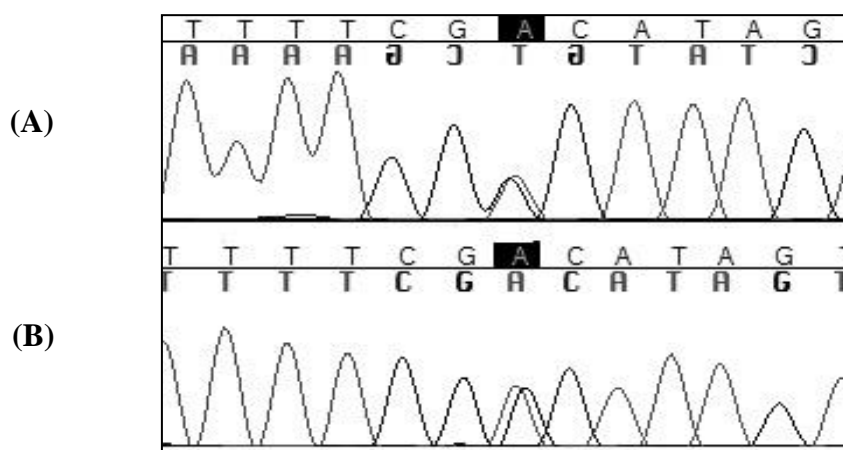


Figura 1 – Representação do variante 213^{A→G}. Eletroferograma gerado pelo software *Sequencher Demo Version 5.1*. (A) Sequência no sentido 3'→5' (B) Sequência no sentido 5'→3'. Marcação em negrito ilustra troca de bases A→G e em homozigose (dupla fita)

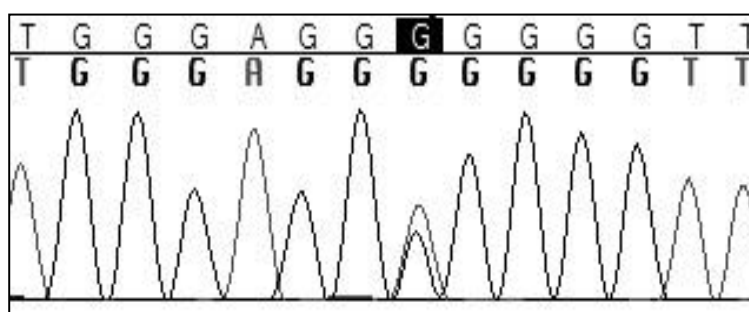


Figura 2 – Representação do variante 13494^{G→A}. Eletroferograma gerado pelo software *Sequencher Demo Version 5.1*. (A) Sequência no sentido 5'→3'; Marcação em negrito ilustra troca de bases G→A.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) – Brasil – Ministério da Saúde. Estimativa/2012 - Incidência de Câncer no Brasil [acesso em fev 2013] Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>.
2. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: Pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*, 2010 (4) 255-66.
3. IARC – International Agency for Research on Cancer – France – IARC TP53 Database [acesso em fev 2013] Disponível em: <<http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>>.
4. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8 (4): 275-3.
5. Hosny G, Farahat N, Hainaut P. TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Letters* 2009; 275: 234–9.
6. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation humanhaplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; (449): 851–1.
7. IHMC - The International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature* 2003;(426), 789–6.
8. Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991; (6), 169.
9. Borkowska E, Binka-Kowalska A, Constantinou M, Nawrocka A, Matych J, Kaluzewski B. P53 mutations in urinary bladder cancer patients from Central Poland. *J Appl Genet* 2007; 48(2), 177–3.
10. Schuyer M, Henzen-Logmans SC, Van Der Burg ME L, Fieret EJH , Klijn JG M, Foekens JA, et al. High prevalence of codon 213^{ARG→STOP} mutations of the *TP53* gene in human ovarian cancer in the southwestern part of the Netherlands. *Int J Cancer* 1998 May; 76(3):299-3
11. de la Calle-Martfn O, Romero M, Fabregat V, Ercilla G, Vives J, Yagüe J. *Nucleic Acids Res* 1990 Aug; 25, 18(16):4963.
12. Chumakov PM, Jenkins JR. BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nucleic Acids Res* 1991 Dec; 25:19(24):6969.

13. McDaniel T, Carbone D, Takahashi T, Chumakov P, Chang E H, Pirollo K, et al. The MspI polymorphism in intron 6 of *p53* (TP53) detected by digestion of PCR products. *Nucleic Acids Res* 1991 Sep; 11, 19(17): 4796.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1.21 section.
15. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat. Acad. Sci* 1977; 74(12), 5463-67.
16. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 2009 Feb; 9(2):95-107. doi: 10.1038/nrc2584.
17. Gemignani, F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 2004 Mar; 11;23(10):1954-6.
18. Xu CT, Zheng F, Dai X, Du J D, Liu H R, Zhao L, et al. Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(9):4305-9.
19. Arora J, Saraswathy KN, Deb R. Effect of maternal Tp53 gene G412C polymorphism on neural tube defects: A study from North India. *Indian J Hum Genet*. 2012 May-Aug; 18(2): 177–2. doi: 10.4103/0971-6866.100757.
20. Simão T, Ribeiro FS, Amorim LMF, Albano R M, Andrada-Serpa M J, Cardoso LEB, et al. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: Association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer* 2002 Sep; 1:101(1):69-3.
21. Pilger DA, Lopez PLC, Segal F, Leistner-Segal S. Analysis of R213R and 13494 g⁻a polymorphisms of the p53 gene in individuals with esophagitis, intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus compared with a control group. *Genomic Med* 2007;1(1-2):57-3. doi: 10.1007/s11568-007-9007-4.
22. Mazars GR, Jeanteur P, Lynch H T, Lenoir G, Theillet C. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene* 1992 April; 7(4):781–2.

ANEXO I – Aceite de 2º publicação de artigo científico

Aceite de 2º publicação de artigo científico

Molecular Medicine Reports
Mimet House, 5a Praed Street, London W2 1NJ, United Kingdom

June 27, 2014

MS No.: MMR-5083-E131133

Title: Mass Spectrometry protein identification from dried Nipple Aspirate Fluid spots on Guthrie Cards

By: Delmonico et al.

Professor Gilda Alves

We are pleased to inform you that the above manuscript has been accepted for publication in Molecular Medicine Reports.

The manuscript will be sent for production shortly. Once production has been completed, the page proofs of the manuscript will be sent to you for correction. No further action is required on your part until the proofs have been prepared.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions in the interim.

Yours sincerely,

Demetrios A. Spandidos

Author PDF file will be provided on publication.

Spandidos Publications UK Ltd
Mimet House, 5a Praed Street
London W2 1NJ
United Kingdom
Tel: +44 (0)20 7262 8050
Fax: +44 (0)20 7262 9825
E-mail: mmr@spandidos-publications.com
Website: www.spandidos-publications.com

ANEXO J – Artigo 2

Formato de artigo 2

Mass Spectrometry protein identification from dried Nipple Aspirate Fluid spots on Guthrie CardsLucas Delmonico^{1,2}Vivian Rabello Areias¹Rodrigo César Pinto¹Cintia da Silva Matos^{1,3}Marco Felipe Franco Rosa⁴Carolina Maria de Azevedo⁴Gilda Alves^{1,2}

¹ Laboratório de Genética Aplicada, Serviço de Hematologia, HC I, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Brazil

³ Laboratório de Patologia Clínica, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Serviço de Radiologia, Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence to:

Gilda Alves

Instituto Nacional de Câncer

Serviço de Hematologia

Laboratório de Genética Aplicada

Pç. da Cruz Vermelha, 23, 6º andar

20230-130 - Rio de Janeiro - RJ

Brasil

Office phone number: 55 21 3207 1805

Lab phone number: 55 21 3207 1622

Email:gbrown@inca.gov.br

Key words: nipple aspirate fluid, breast neoplasms, proteome, mass spectrometry, Guthrie card.

Running title: Nipple Aspirate Fluid proteins on Guthrie Cards, Lucas Delmonico

Abstract

NAF (nipple aspirate fluid) should be investigated as a potential source of biomarkers for early diagnosis or for risk assessment of breast cancer as well as other breast disorders. In this paper, we show that proteins were easily extracted from dried NAF spot on Guthrie cards and were good for mass spectrometry analysis. NAF from 80 women was collected on Guthrie cards from 2007 to 2010. NAF-proteins were extracted from the Card with incubation in water. These proteins were quantified and separated in a one-dimensional (12% SDS-PAGE) gel electrophoresis and in high-resolution gradient gels with different concentrations (4-12%, 8-16%, 4-20%). Bands in evidence were excised from the gradient gels and the within proteins were identified by LC-Q-TOF (liquid chromatography quadrupole time of flight). Immunoglobulins, Zn- α 2-Glicoprotein, Apolipoprotein D, and Prolactin Inducible Protein were among the bands assessed. These proteins were previously described, confirming the feasibility of the NAF-Guthrie Card collecting method. The NAF-Guthrie Card collecting method has shown many advantages, such as being inexpensive, non-invasive, reliable, painless, and easily stored in room temperature. Examining NAF may help to identify individuals with higher risk for breast cancer and to improve clinical conduct.

Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women and 99% of breast cancers originate in the ductal and lobular epithelia (1,2). Unfortunately, currently available breast cancer screening tools such as mammography and careful palpation of the breasts miss up to 40% of early breast cancers and are least effective in detecting cancer in young women, whose tumors are often more aggressive (2). Moreover, additional invasive diagnostic methods (needle or surgical biopsy) are required to determine whether the breast lesion is cancerous. Despite mammography, many breast cancers still escape detection at an early stage in Brazil (3). All these facts together make the development of noninvasive methods to diagnose early-stage breast cancer necessary.

The NAF (nipple aspirate fluid) is continuously secreted and reabsorbed in non-pregnant/non-lactating women from the ductal and lobular system of the breast (4). NAF is a potential source of biomarkers for early diagnosis or risk assessment of breast cancer. NAF may occur at all ages from puberty to menopause and can arise from malignant breast tumors as well as from benign diseases (inflammation, fibrocystic diseases, and ductal ectasia) (5).

Due to the difficulties encountered by investigators to collect NAF, we tested the application of Guthrie cards in absorbing NAF for later protein extraction. The Guthrie card is commonly used to collect a blood spot routinely by heel prick on newborns to test metabolic disorders such as phenylketonuria (6). Guthrie cards are appropriate for protein conservation.

In this paper, we show that proteins can be extracted from dried NAF spots on Guthrie cards. In order to verify the feasibility of this method, we carried out a qualitative proteomics analysis by LC-Q-TOF (liquid chromatography quadrupole time of flight) of some of the proteins obtained by this method and separated in high-resolution gradient gels.

Materials and Methods

Subjects

The Ethical Committees from Hospital Universitário Gaffrée Guinle (HUGG - 13/07) approved subject participation for this study; informed consent was obtained in all cases. Between May 2007 and December 2010, 88 eligible women were recruited with spontaneous nipple discharge at HUGG. Recruited women were 18 years or older. Reasons for exclusion included pregnancy, lactation within the last 12 months, previous subareolar or other surgery that could disrupt the ductal systems, and immunological deficiency by virus. Some subjects had specimens analyzed from one breast only, whereas others had specimens analyzed from both breasts. As for the origin of the discharge, some women had their effusion from an orifice, or more. NAF were classified considering their macroscopical aspect such as watery, citrine, serous, bloody, and mixed (seropurulent). All participants were subjected to mammography and breast ultrasonography exams and clinical evaluation.

NAF collection

NAF was collected using a modification of a technique that was previously described (7,8). Subjects had their breasts warmed for 10-30 min with bilateral (hot compress) pads wrapped in towels. The nipple was cleaned with alcohol and the breast was gently massaged from the chest wall toward the nipple for 1 min. After the participant gently compressed the breast with both hands, we collected the fluid, which appeared in the form of droplets, onto Guthrie cards (Whatman™, USA), (Fig. 1), and stored at room temperature (Fig. 2). Up to three attempts were made on each breast. If no fluid appeared after these attempts, the participant was considered a non-provider. NAF-Guthrie cards had been stored for a period of 2 to 4 years.

Protein extraction and gels

Guthrie spots were cut into segments of about 6mm² and each piece was incubated in 100µl double-distilled water for 30 min at 56°C. Soluble NAF proteins were mixed with 1µl of PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 0.2 mg/ml, (Sigma, St. Louis, MO, USA) and measured using the method of BCA (Bicinchoninic acid) or Smith reagent (9).

NAF proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis with SDS-PAGE and β-mercaptoethanol. The stacking gel was done with 4% acrylamide Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, containing 0.4% SDS, and the separating gel was prepared with 12% acrylamide Tris-HCl buffer 1.5 M, pH 8.8, containing 0.4% SDS. The electrode buffer used was Tris-glycine (0.025 M Tris base and 0.192 M glycine), pH 8.3, containing 0.1% SDS. From each sample, 20 µg was mixed with sample buffer to the final concentrations of 0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol and 0.025% bromophenol blue. Samples were heated to 95°C for 3 min and loaded on the gel in the Mini-Protean II system (Bio-Rad, USA), running at 39 mA/120V for 90 min. Molecular weight standard was Benchmark Protein Ladder (I n v i t r o g e n[®], USA). After electrophoresis, the gels were fixed for 1 h in a solution of 40% (v/v) aqueous ethanol and 10% (v/v) acetic acid. The gels were washed for 30 min in fresh fixing solution and incubated with Coomassie blue R-250 0.2% diluted in fixative solution for 2 h. Gels were destained using fixative solution for 2 h, followed by incubation in w a t e r until complete destaining.

NAF proteins were also separated by commercial gradient gels, with concentrations of 4-12%, 8-16%, and 4-20%. Five micrograms of total protein was applied to the gel with sample buffer 1:1 (50 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 0.1% bromophenol blue; 10% glycerol). This system has a horizontal electrophoresis field and the gels are made from buffers that allow better resolution for complex samples. Molecular weight standard used was Benchmark Protein Ladder (I n v i t r o g e n[®], USA). After electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Blue R-250, according to the protocol specified by the company and analyzed for integrity of the proteins and the profile of the revealed bands.

Enzymatic Digestion for nLC-Q-TOF experiments

Selected bands were excised to destain and subject to enzymatic digestion according to Shevchenko et al. with modifications (10). The destaining phase was modified, with the bands

being destained in a solution of 25mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) pH 8.8 / 50% and ACN (Acetonitrile) overnight on the shaker, at room temperature. All samples were concentrated in a Speed-Vac Centrifuge (Savant, Minnesota, USA) to produce a 20 μl final volume of DIUs (Digested ultrafiltrate sample).

Analysis of DIUs by nLC-Q-TOF

Before taking the DIUs to analyze the nLC-Q-TOF, they underwent a manual desalination Zip Tip (Eppendorf, Germany). Each Zip Tip was activated with 10 μl of ACN 100% and washed three times with 10 μl of ultrapure sterile water, and then 10 μl of the sample was loaded by pipetting ten times up and down in the tube itself. Each Zip Tip was washed three times with sterile ultrapure water and finished with an ACN elution. In the end, the samples were reduced to a final volume of 20 μl and stored at -20°C until analysis in the mass spectrometer.

The extracted peptides from SDS-PAGE gel slice were loaded onto ESI-Q-TOF mass spectrometry (WatersCorp., Manchester, UK). First, the sample DIUs were loaded onto the Waters® nanoACQUITY UPLC® System (Waters, Milford, MA) with a Waters Opti-Pak C18 trap column coupled to Q-ToF Ultima® (Waters, Milford, MA). 3.0 μl of sample was injected into a nanoEase C18 150 mm x 75 μm column (Waters, Milford, MA) at a flow rate of 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ and eluted with ACN containing 0.1% formic acid. The instrument control and data acquisition were conducted by a MassLynx data system (Version 4.0, Waters). The experiments were performed by scanning from a mass-to-charge ratio (m/z) of 200 to 2000. Exact mass MS/MS was automatically determined using the Q-ToF's LockSpray™ (Waters, Milford, MA, USA).

Database searching

Data were processed using ProteinLynx Global Server (version 2.0, Waters) for ESI-Q-TOF (electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass) analysis. The proteins were identified by the correlation of tandem mass spectra to the NCBI nr proteins and MSDB database, using the MASCOT online software (www.matrixscience.com). The first analysis considered all taxonomies, while the second analysis was restricted to Homo sapiens to remove the redundancy of protein identifications.

Breast images investigation

Conventional mammography was performed in a Mediman HFG/B unit with Kodak Min-R- 2000 Film and Kodak RP- X-Omat processor. The ultrasonography was used as a complementary exam to the conventional mammography, executed in a Hewlett Packard unit, type Image Point Hx, with two transducers of 7.5 MHz and 10 MHz that allowed measuring the diameters of breast ductals. The images were classified by the BI-RADS (Breast imaging reporting and data system).

Results

From the 88 women enrolled in this study, 80 (91%) successfully yielded NAF collected on the first visit and absorbed on Guthrie cards, only by the gentle massage and

warming protocol procedure. Later, 2 patients were excluded. Thus, the study group was composed of 78, with a mean age of 50.24 years (ranging 23 to 77 years) and menarche at a mean age of 13.24 years (ranging 9 to 18 years). Forty-three women (55%) were postmenopausal. The mean age at menopause was 48.58 years (ranging 36 to 54 years). Sixty-four women became pregnant, and of these, 11 (11%) did not breastfeed. Of the total group, 18 women (23%) suffered abortion, 8 not spontaneous (44%) and 10 spontaneous (66%). 52 women (67%) reported having a case of cancer in the family, but only 4 reported cases of breast cancer in the family, and of these, only one confirmed case of hereditary breast cancer. Results of mammography exams assigned 73% of patients to the zero BI-RADS category, making it necessary to conduct additional tests. Of these, only 46% had ultrasonography and 77% had their results as BI-RADS 3. Therefore, we performed ultrasound and observed the predominance of ductal ectasias (Fig. 5). In addition, other injuries were observed, such as presence of nodules, axillary lymph nodes, and microcalcification.

We obtained 106 NAF spots on the cards, which were classified into the five types (watery, citrine, serous, bloody, and mixed (Table I). This high number is explained by the fact that from 28 women the fluid was obtained from both breasts. The NAF classification from both breasts was the same except for three cases (3/28).

NAF protein concentration ranged from 6.8 to 11.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, with a mean value of 9.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Analysis of the NAF proteins was performed in a one-dimensional SDS-PAGE 12%. Gel electrophoresis revealed five major bands with approximately the same amounts in all samples. Using the Guthrie card collection method, the proteins showed a similar band pattern in gel as described by Varnum et al. and Manello et al. that applied an aspiration system (Fig. 2), (11,12). We verified different default bands in protein gel as band presence, band absence, and band intensity variation (Fig. 3). The gradient gels showed no bands different from those shown on SDS-PAGE 12% (Fig. 4). The gel of 4-12% showed the best resolution, for this reason it was our preference. The main difference was verified in the bands with sizes less than 20 kb. This difference still needs further investigation but seems to be associated with cystic breast disease and benign breast lesions (10,13).

Of the bands excised, the spectra predominates were identified and peptide score was calculated as $-10\text{Log}(P)$, where $P(0.05)$ is the probability that the observed match is a random event. Table II shows major proteins that were identified with a score greater than 50 in nLC-Q-TOF. Immunoglobulins, Zn- α 2-Glicoprotein, Apolipoprotein D, and Prolactin Inducible Protein were among the bands assessed. These proteins were previously described, confirming the feasibility of the NAF-Guthrie Card collecting method.

Discussion

The current investigation of the breast epithelium directly with core needle biopsy is an invasive method. Sometimes, even the uncomfortable ductal lavage is performed to detect malignancy. On the other hand, the NAF-Guthrie card collecting method is inexpensive, non-invasive, reliable, and painless. Such method may broaden the applicability of NAF sample collection and may be an advantage over the Sauter et al. method, which applied an aspiration device (11). Moreover, Guthrie cards occupy little space and can be stored at room temperature with dried NAF. These characteristics allow the cards to be sent to a laboratory in a plastic bag.

The associations of the results from imaging studies were hampered by their own issues in the public health system in Brazil; however, it was possible to observe a strong relationship between ductal ectasia and the secretion of NAF. In addition, most had a mammogram result of BI-RADS 0, which raises an alert because some non-palpable lesions disturb the results, leading to a false-negative diagnosis (14).

The selected women had a low percentage of use of hormone therapy, or even oral contraceptives (data not shown), which does not allow associations between the secretion of nipple fluid and these variables. Still, it can be inferred that the smaller 20 KDa protein, in particular the Gross cystic disease fluid protein, as described by Manello et al. is strongly associated with changes in the breast (15,16). HER2 (human epidermal growth factor Receptor-2) is one of the breast cancer subtype biomarkers; its amplification/overexpression is associated with aggressive disease and worse prognosis (17). In DCIS (ductal carcinoma in situ), HER overexpression was found by immunohistochemistry and correlated with higher proliferative activity (18). HER2 has already been detected in NAF, as well as breast related hormones, metabolites and growth factors (19-23). Thus, we propose that breast cancer biomarkers can be detected from dried NAF spot in Guthrie cards, followed by mass spectrometry analysis. In this paper, for research purposes, we have made gels from NAF proteins to characterize them; however, we suggest that for clinical use, the shotgun mass spectrometry approach (no in-between gel) is fully appropriate.

In conclusion, the NAF-Guthrie card collecting method, as applied in our study, has proved to be suitable for modern mass spectrometry analysis. This method has potential application for early breast cancer screening and subtype classification.

Acknowledgements

We acknowledge the Mass Spectrometry Facility at Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil for their support on mass spectrometry analysis and Prof. Márcia Regina Soares da Silva and student Rosane Nunes of Instituto de Química of Universidade Federal do Rio de Janeiro for technical assistance.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (Bolsa 102.558/2012, APQ1 E-26/110.319/2008, APQ1 E-26/110.803/2009) and Programa de Oncobiologia, Rio de Janeiro, Brazil.

References

1. West KE, Wojcik EM, Dougherty TA, et al: Correlation of nipple aspiration and ductal lavage cytology with histopathologic findings for patients before scheduled breast biopsy examination. *The American J of Surgery* 191: 57-60, 2006.
2. Alexander H, Stegner AL, Wagner-Mann C, et al: Proteomic Analysis to Identify Breast Cancer Biomarkers in Nipple Aspirate Fluid. *Clin Cancer Res* 10: 7500–7510, 2004.
3. Pawlik TM, Hawke DH, Liu Y, et al: Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. *BMC Cancer* 6: 68-78, 2006.
4. Lang JE and Kuerer HM: Breast ductal secretions: clinical features, potential uses, and possible applications. *Cancer Control* 14: 350-359, 2007.
5. Hirose M, Nobusawa H and Gokan T: Ductography: comparison with conventional ductography as a diagnostic method in patients with nipple discharge. *Radiographics* 27: 183-196, 2007.
6. Guthrie R: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32: 338-343, 1963.
7. Borte S, Janzi M, Pan-Hammarström Q, et al: Placental transfer of maternally-derived IgA precludes the use of guthrie card eluates as a screening tool for primary immunodeficiency diseases. *PLoS One* 7: e43419, 2012.
8. van Ommen CC, Elvers LH, Notermans DW, et al: Antibody levels against *B. pertussis* in neonates measured in dried blood spots. *Vaccine* 30: 2697-2700, 2012.
9. Tan HK, Petersen E, Møller LN, et al: Recovery of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M in stored guthrie card blood spots. *J Clin Microbiol* 47, 2626-2628, 2009.
10. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858, 1996.
11. Sauter ER, Ross E, Daly M, et al: Nipple aspirate fluid: a promising non-invasive method to identify cellular markers of breast cancer risk. *Br J Cancer* 76: 494-501, 1997.

12. Varnum SM, Covington CC, Woodbury RL, et al: Proteomic characterization of nipple aspirate fluid: identification of potential biomarkers of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 80: 87-97, 2003.
13. Sartorius OW, Smith HS, Morris P, et al: Cytologic evaluation of breast fluid in the detection of breast disease. *J Natl Cancer Inst* 59: 1073-1080, 1977.
14. Manello F, Medda V and Tonti GA: Protein profile analysis of the breast microenvironment to differentiate healthy women from breast cancer patients. *Expert Rev Proteomics* 43: 43-60, 2009.
15. Manello F, Tonti GA and Papa S: Human gross cyst breast disease and cystic fluid: bio-molecular, morphological, and clinical studies. *Breast Cancer Res Treat* 97: 115-129, 2006.
16. Hamy AS, Giacchetti S, Albiter M, et al: BI-RADS categorisation of 2,708 consecutive nonpalpable breast lesions in patients referred to a dedicated breast care unit. *Eur Radiol* 22: 9-17, 2012.
17. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al: HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 50: 4332-4337, 1990.
18. Allred DC, Clark GM, Molina R, et al: Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 23: 974-979, 1992.
19. Kuerer HM, Thompson PA, Krishnamurthy S, et al: High and differential expression of HER-2/neu extracellular domain in bilateral ductal fluids from women with unilateral invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 601-605, 2003.
20. Gann PH, Geiger AS, Helenowski IB, et al: Estrogen and progesterone levels in nipple aspirate fluid of healthy premenopausal women: relationship to steroid precursors and response proteins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 39-44, 2006.
21. Loud JT, Gierach GL, Veenstra TD, et al: Circulating estrogens and estrogens within the breast among postmenopausal BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 143: 517-529, 2014.
22. Fought AJ, McGathey C, Scholtens DM, et al: Hormonal determinants of nipple aspirate fluid yield among breast cancer cases and screening controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22: 2277-2284, 2013.

23. Tredwell GD, Miller JA, Chow HH, et al: Metabolomic characterization of nipple aspirate fluid by ^1H NMR spectroscopy and GC-MS. *J Proteome Res* 13: 883-889, 2014.

Figure Legends

Figure 1. Collection of NAF

Figure 2. NAF spot absorbed on Guthrie card

Figure 3. One-dimensional electrophoresis showing NAF proteins stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1 bloody NAF; Lanes 2, 3, 4 watery NAF; Lane 5 BSA (bovine serum albumin); Lanes 6, 11 Molecular Weight; Lanes 7, 8, 9 Mixed NAF ; Lane 10 citrine NAF.

Figure 4. High Resolution Gradient Gel 4-12% (GE™ Healthcare Amersham™ ECL™) electrophoresis showing NAF proteins. Lanes 1, 8, 13 - Molecular Weight; Lanes 2, 5 – Blanks; Lanes 3, 7 – bloody NAF; Lanes 4, 10 – mixed NAF, Lane 6 – watery NAF; Lane 9 – Citrine NAF; Lanes 11, 12 – Serous NAF. Arrows indicate bands that were excised for the proteomic analysis.

Figure 1. Collection of NAF



Figure 2. NAF spot absorbed in Guthrie card

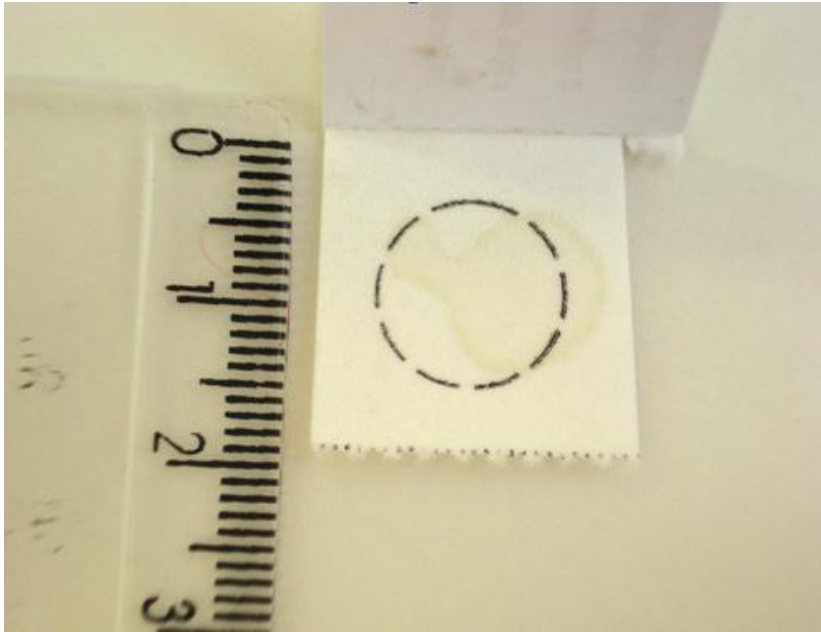


Figure 3 – One-dimensional electrophoresis showing NAF proteins stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1 bloody NAF; Lanes 2, 3, 4 watery NAF; Lane 5 BSA (bovine serum albumin); Lanes 6, 11 Molecular Weight; Lanes 7, 8, 9 Mixed NAF ; Lane 10 citrine NAF.

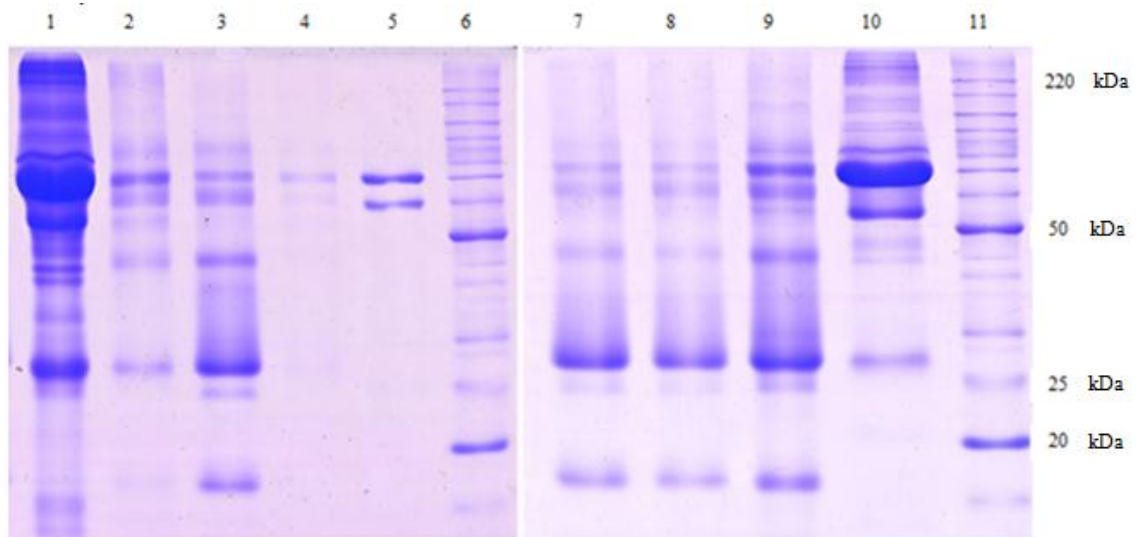


Figure 4 – High Resolution Gradient Gel 4-12% (*GE™ Healthcare Amersham™ ECL™*) electrophoresis showing NAF proteins. Lanes 1, 8, 13 - Molecular Weight; Lanes 2, 5 - Blanks; Lanes 3, 7 - bloody NAF; Lanes 4, 10 - mixed NAF, Lane 6 - watery NAF; Lane 9 - Citrine NAF; Lanes 11, 12 - Serous NAF. Arrows indicate bands that were excised for the proteomic analysis.

