

CAROLINE CRISTIANE BERNARDI

**ESTUDO SOBRE AMPLIFICAÇÃO E DELEÇÃO DOS GENES *BCHE* E
ACHE EM PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

**Curitiba
2008**

CAROLINE CRISTIANE BERNARDI

**ESTUDO SOBRE AMPLIFICAÇÃO E DELEÇÃO DOS GENES *BCHE* E
ACHE EM PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleidi Alice
Chautard-Freire-Maia

**Curitiba
2008**

**Dedico este trabalho à minha
querida e amada família, pelos
milhares momentos de alegria
e pelo amor, sempre.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, pela confiança em mim depositada, pela ajuda, disponibilidade, atenção e amizade nesses dois anos.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Eleidi Alice Chautard Freire Maia, pelas correções e valiosas sugestões na finalização do presente trabalho.

Aos Profs. Dr. Iglénir João Cavalli e Dr.^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, pela concessão das amostras analisadas, empréstimos de equipamentos do laboratório e ainda pela contribuição durante e também na finalização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Daniela Parada Pavoni, pela disponibilidade em sempre me receber, pela inestimável ajuda e ensinamentos sobre a metodologia aqui empregada, pelo empréstimo de material e equipamentos e pelas correções e sugestões durante e na finalização deste trabalho.

À Andréia, pela preciosa ajuda na realização deste trabalho, pela amizade e pelo crachá do Roberto, e à Cheysa e à Raquel, por gentilmente cederem alguns horários para que eu pudesse utilizar o equipamento.

Ao pessoal do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, pela amizade, agradável convívio e ajuda nas atividades diárias, em especial à Delly, pelas risadas, pelo ombro amigo, pelos desabafos, por estar sempre disposta a ajudar e por enfrentar comigo o difícil momento da impressão deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, por sempre me receberem bem e me emprestarem o “mouso” todas as vezes que precisei, em especial à Márcia, pela amizade e pela ajuda com as amostras.

A todos os meus colegas de mestrado, Rê, Márcia, Carol, Thaís, ClinClin, Fábio, Vítor, Delly e Pati (amigas superpoderosas), pela alegre convivência ao longo desses dois anos, pela parceria nas festas e nos grupos de estudo, pelas risadas e pela inestimável amizade.

A todos do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, alunos, professores, técnicos e funcionários, pela ajuda, pelas conversas e risadas pelos corredores e pela alegre companhia nas festas.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Karin Braun, à Dani Malheiros e à Luciana Costa pela disposição e ajuda nos primeiros contatos com a PCR em tempo real.

Aos amigos que, mesmo longe e às vezes sem perceberem, me deram forças para continuar.

Aos meus pais, Valdir e Lucia, e irmãos, Fabiano, Daniella e Gustavo, e à Michele, por não medirem esforços para me ajudar, por compreenderem a necessidade de minha ausência nesses anos, por serem pessoas muito especiais, pelo exemplo, respeito e pela alegria.

A todos da minha família, vô e vó, tios e tias, primos e primas, por só me proporcionarem alegrias.

À DEUS, pela beleza da vida e por colocar todos vocês em meu caminho...

Muito Obrigada!!

RESUMO

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) são enzimas do grupo das hidrolases que desempenham um importante papel na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Há evidências de que essas enzimas participem do controle da proliferação e diferenciação celular e que, por esse motivo, possam ter alguma influência no processo de tumorigênese. De fato, já foi demonstrado que os genes das colinesterases estão estruturalmente alterados ou se expressando de maneira aberrante em uma série de tipos tumorais. Nesse estudo, investigou-se a possível alteração (amplificação ou deleção) dos genes *ACHE* e *BCHE* em tumores de mama esporádicos de 55 pacientes. A amplificação dos segmentos foi realizada por meio da PCR em tempo real e analisadas utilizando-se o método da quantificação relativa, tendo como controle amostras do sangue periférico de cada paciente. Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa Statistica for Windows (StatSoft, Inc, 2000). Foi observado que os genes *BCHE* e *ACHE* estão deletados em 56,36% e 43,64% dos casos, respectivamente, e ambos encontraram-se amplificados em 23,64% dos casos. Observou-se ainda que, embora estejam localizados em cromossomos diferentes, as alterações dos genes das colinesterases correlacionam-se entre si. Relacionando-se os resultados obtidos com alguns dados clínico-histopatológicos, verificou-se que a amplificação do oncogene *ERBB2* está correlacionada com a deleção dos genes *ACHE* e *BCHE*, e que o número de alterações nos genes das colinesterases aumenta conforme aumenta o grau de malignidade do tumor.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase. Acetilcolinesterase. Amplificação gênica. Deleção gênica. Câncer. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are enzymes of the hydrolases group that have an important role in the cholinergic neurotransmission and also in other physiologic functions. Increasing evidence supports the involvement of these enzymes in the cell proliferation control and differentiation, and for this reason they might have an influence in tumorigenesis. In fact, it has already been shown that the cholinesterase genes are structurally altered or aberrantly expressed in a variety of tumor types. In this study, possible alterations (amplification or deletion) in the *ACHE* and *BCHE* genes were investigated in sporadic breast tumors of 55 patients. The segment amplification was performed by real time PCR and analyzed using the relative quantification method; the peripheral blood samples of each patient were used as control. For statistical analysis, the program Statistica for Windows (StatSoft, Inc, 2000) was used. Deletions of the *BCHE* and *ACHE* genes were observed in 56.36% and 43.64% of the tumors, respectively, and both of them were found to be amplified in 23.64% of the cases. Although these genes are located in different chromosomes, their alterations were found to be correlated. The results were also related with some of the clinicohistopathological factors and it was observed that the *ERBB2* oncogene amplification is correlated with the deletion of *ACHE* and *BCHE* genes, and the number of alterations of the cholinesterase genes increase as the tumor's malignancy grade increase.

Key-words: Butyrylcholinesterase. Acetylcholinesterase. Gene amplification. Gene deletion. Cancer. Real time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - O GENE <i>BCHE</i>	18
FIGURA 2 - O GENE <i>ACHE</i>	22
FIGURA 3 - GRÁFICO Δ RN (VARIAÇÃO NO SINAL FLUORESCENTE) X NÚMERO DE CICLOS.....	39
FIGURA 4 - EXEMPLO DE CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDAS NA PCR EM TEMPO REAL.....	41
FIGURA 5 - GRÁFICO DE REGRESSÃO LINEAR FORNECIDO PELO SOFTWARE.....	42
FIGURA 6 - EXEMPLO DE CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE TRIPLICATAS CONSIDERADAS PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
FIGURA 7 - CURVAS DA TRIPLICATA DE AMOSTRAS CONSIDERADAS, PORÉM COM RESSALVA.....	44
FIGURA 8 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA CONSIDERADA DE MÁ QUALIDADE E QUE FOI DESCARTADA.....	44
FIGURA 9 - GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDO EM UMA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL REALIZADAS PARA O GENE <i>18S</i>	48
FIGURA 10 - CURVA PADRÃO OBTIDA EM UMA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	48
FIGURA 11 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO OBTIDAS PARA OS 3 GENES.....	51
FIGURA 12 - EXEMPLO DE AMOSTRA COM SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS DAS 55 PACIENTES.....	35
TABELA 2 - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR E COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	40
TABELA 3 - VALORES DE INCLINAÇÃO DA CURVA (<i>SLOPE</i>), COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R^2) E EFICIÊNCIA DE CADA REAÇÃO REALIZADA.....	49
TABELA 4 - QUANTIDADES RELATIVAS DOS GENES <i>BCHE</i> E <i>ACHE</i> E DESVIOS PADRÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DA CURVA PADRÃO E POR MEIO DA RELAÇÃO ($TUMOR_{CHE}/TUMOR_{18S}$)/ ($SANGUE_{CHE}/SANGUE_{18S}$) DE 55 PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER MAMÁRIO ESPORÁDICO	52
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS (%) DE DELEÇÕES, INALTERAÇÕES E AMPLIFICAÇÕES DOS GENES <i>BCHE</i> E <i>ACHE</i> ENCONTRADAS QUANDO O GENE <i>ERBB2</i> ESTAVA OU NÃO AMPLIFICADO.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - MÉDIAS DOS C_TS DOS CONTROLES NEGATIVOS OBTIDAS NAS REAÇÕES REALIZADAS.....50
- GRÁFICO 2** - DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS C_TS DOS CONTROLES NEGATIVOS E AS MÉDIAS DOS C_TS DAS AMOSTRAS DE MAIOR C_T.....50
- GRÁFICO 3** - ALTERAÇÕES DO GENE *BCHE* ENCONTRADAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE 55 PACIENTES.....54
- GRÁFICO 4** - ALTERAÇÕES DO GENE *ACHE* ENCONTRADAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE 55 PACIENTES.....54
- GRÁFICO 5** - ALTERAÇÕES DO GENE *BCHE* ENCONTRADAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE 42 PACIENTES (EXCLUÍRAM-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE).....54
- GRÁFICO 6** - ALTERAÇÕES DO GENE *ACHE* ENCONTRADAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS DE 42 PACIENTES (EXCLUÍRAM-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE).....55
- GRÁFICO 7** - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *ACHE* E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *BCHE*, CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....55
- GRÁFICO 8** - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *ACHE* E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *BCHE*, EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....56
- GRÁFICO 9** - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL QUANTIDADE RELATIVA DO GENE *ACHE* E A VARIÁVEL QUANTIDADE RELATIVA DO GENE *BCHE*, CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....56
- GRÁFICO 10** - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL QUANTIDADE RELATIVA DO GENE *ACHE* E A VARIÁVEL QUANTIDADE RELATIVA DO GENE *BCHE*, EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....57
- GRÁFICO 11** - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL TAMANHO DO TUMOR E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *ACHE*, EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....57

GRÁFICO 12 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÃO DO PROTOONCOGENE <i>ERBB2</i> E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE <i>BCHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	59
GRÁFICO 13 - AMPLIFICAÇÃO DO PROTOONCOGENE <i>ERBB2</i> VERSUS AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE <i>BCHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	59
GRÁFICO 14 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÃO DO PROTOONCOGENE <i>ERBB2</i> E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE <i>ACHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	60
GRÁFICO 15 - AMPLIFICAÇÃO DO PROTOONCOGENE <i>ERBB2</i> VERSUS AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE <i>ACHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	60
GRÁFICO 16 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÃO DO PROTOONCOGENE <i>ERBB2</i> E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE <i>ACHE</i> , EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....	61
GRÁFICO 17 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR E A VARIÁVEL ALTERAÇÕES DO GENE <i>BCHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	62
GRÁFICO 18 - GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR VERSUS ALTERAÇÕES DO GENE <i>BCHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	62
GRÁFICO 19 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR E A VARIÁVEL ALTERAÇÕES DO GENE <i>BCHE</i> , EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....	63
GRÁFICO 20 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR E A VARIÁVEL ALTERAÇÕES DO GENE <i>ACHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	63
GRÁFICO 21 - GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR VERSUS ALTERAÇÕES DO GENE <i>ACHE</i> , CONSIDERANDO-SE TODAS AS AMOSTRAS.....	64
GRÁFICO 22 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL USO DE PÍLULA ANTICONCEPCIONAL E A VARIÁVEL QUANTIDADE RELATIVA	

DO GENE *BCHE*, EXCLUINDO-SE AS AMOSTRAS COM
COMPORTAMENTO DIFERENTE.....64

GRÁFICO 23 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL USO DE PÍLULA
ANTICONCEPCIONAL E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E
DELEÇÕES ENCONTRADAS PARA O GENE *BCHE*, EXCLUINDO-
SE AS AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....65

GRÁFICO 24 - CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL IDADE DA PRIMEIRA
GRAVIDEZ E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES
ENCONTRADA PARA O GENE *BCHE*, EXCLUINDO-SE AS
AMOSTRAS COM COMPORTAMENTO DIFERENTE.....65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Colinesterases.....	16
2.1.1 Butirilcolinesterase.....	17
2.1.2 Acetilcolinesterase.....	21
2.2 Câncer de Mama.....	24
2.3 Colinesterases e o Câncer.....	27
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específico.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Caracterização da Amostra.....	34
4.2 Coleta e Armazenamento das Amostras.....	36
4.3 Extração do DNA Sangüíneo.....	36
4.4 Extração de DNA do Tecido Tumoral.....	37
4.5 PCR em Tempo Real.....	37
4.5.1 Oligonucleotídeos Iniciadores.....	39
4.5.2 Concentração das Amostras.....	40
4.5.3 Amplificação do DNA.....	40
4.5.4 Construção da Curva Padrão.....	41
4.5.5 Critérios de Análise das Curvas de Amplificação.....	42
4.5.6 Interpretação e Análise dos Dados.....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1 PCR em Tempo Real.....	47
5.2 Controles Negativos e Temperaturas de <i>Melting</i>	49
5.3 Amplificações e Deleções dos Genes <i>BCHE</i> e <i>ACHE</i>	52
5.4 Correlações das Amplificações e Deleções dos Genes <i>ACHE</i> e <i>BCHE</i> com os dados Clínico-Histopatológicos.....	57
6. DISCUSSÃO.....	66
6.1 PCR em Tempo Real.....	66
6.2 Controles Negativos e Temperaturas de <i>Melting</i>	68
6.3 Amplificações e Deleções dos Genes <i>BCHE</i> e <i>ACHE</i>	69
6.4 Correlações das Amplificações e Deleções dos Genes <i>ACHE</i> e <i>BCHE</i> com os dados Clínico-Histopatológicos.....	74
7. CONCLUSÕES.....	76
8. REFERÊNCIAS.....	77
9. APÊNDICE.....	94

1. INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase e a acetilcolinesterase são hidrolases que catalizam a hidrólise de ésteres de colina.

A butirilcolinesterase exibe ampla distribuição, sendo particularmente abundante no fígado, onde é sintetizada, e no plasma. Hidrolisa preferencialmente a butirilcolina e, embora não tenha uma função fisiológica bem definida, sabe-se que desempenha um importante papel no metabolismo de compostos clinicamente importantes, como a succinilcolina e a procaína, que são agentes anestésicos, além de numerosos outros ésteres (GALENKO-YAROSHEVSKII, 2003). Possui variantes genéticas, as quais são responsáveis, em parte, pela variabilidade observada na duração de ação dessas drogas (RANG, DALE & RITTER, 2001).

A acetilcolinesterase também é encontrada em vários locais do corpo, sendo o mais importante a junção neuroefetora colinérgica. Ela apresenta relativa especificidade ao neurotransmissor acetilcolina, sendo de fundamental importância nas respostas neuronais (CRAIG & STITZEL, 2005).

Há evidências de que as colinesterases estejam envolvidas em funções “não-clássicas”, tal como o controle da proliferação e diferenciação celular (LAYER, 1991; BEM AZIZ-ALOYA *et al.*, 1993; LAYER & WILLBOLD, 1995), o que sugere uma possível influência dessas enzimas no processo de tumorigênese. De fato, já foram demonstradas alterações na atividade ou no número de cópias das colinesterases em câncer de cólon (MONTENEGRO *et al.*, 2005), câncer de pulmão (MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 2006), cânceres que acometem o sistema nervoso (GNATT *et al.*, 1990; PERRY *et al.*, 2002; VIDAL, 2005), carcinoma de ovário (ZAKUT *et al.*, 1990), leucemias (LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989) e ainda as regiões em que os genes *BCHE* e *ACHE* se encontram já foram observadas estarem amplificadas em neoplasias da mama, da próstata e de cabeça e pescoço (BUERGER *et al.*, 1999; HIBI *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2006; JUNG *et al.*, 2006), e deletadas em cânceres da tireóide e em leucemias (STEPHENSON, 1996; MARSH *et al.*, 2003).

Se essas enzimas realmente exercerem alguma influência nesses processos, a alteração da estrutura e da expressão dos genes *ACHE* e *BCHE* pode conferir uma vantagem seletiva de rápido crescimento celular em áreas localizadas no tecido tumoral, interferindo na etiologia da doença (ZAKUT *et al.*, 1990). É importante, portanto, que se esclareçam esses eventos de amplificação e/ou deleção, quais os

genes envolvidos e sua influência no processo de tumorigênese, até mesmo porque, de acordo com RÁCZ *et al.* (1999), a detecção de um gene alterado em células tumorais pode contribuir para estabelecer o prognóstico da neoplasia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Colinesterases*

As colinesterases (ChEs) são enzimas do grupo das hidrolases que catalizam a hidrólise dos ésteres de colina, desempenhando papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas.

Existem dois tipos principais de colinesterase: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), que são estreitamente relacionadas na sua estrutura molecular, mas que diferem na sua distribuição, especificidade de substrato e funções (RANG, DALE & RITTER, 2001). A AChE exibe uma especificidade para a acetilcolina e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular (BARNARD, 1974 *apud* PATOCKA, KUČA & JUN, 2004); já a BChE não é tão específica e catalisa a hidrólise desse neurotransmissor e de outros ésteres (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989).

Tanto a BChE quanto a AChE existem como polímeros de subunidades catalíticas, que assumem formas globulares ou assimétricas. As formas globulares são chamadas G₁, G₂ e G₄, e possuem uma, duas e quatro subunidades, respectivamente. As formas assimétricas têm como subunidade de um a três tetrâmeros (A₄, A₈ e A₁₂, respectivamente) ligados por pontes de dissulfeto associados a uma fita de colágeno (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989), por meio da qual são fixadas à membrana basal em vários locais, como nos eritrócitos e na placa motora terminal (RANG, DALE & RITTER, 2001).

A BChE e a AChE possuem uma homologia de 65% em sua seqüência de aminoácidos, e suas estruturas do sítio ativo são bastante semelhantes, embora sejam produtos de genes diferentes (ALLDERDICE *et al.*, 1991). Essa ampla homologia sugere que os genes dessas enzimas (*BCHE* e *ACHE*) possam ter surgido da evolução de um precursor comum (SMALL, MICHAELSON & SBERNA, 1996). Ambas são glicoproteínas (MILLARD & BROOMFIELD, 1992) e possuem um resíduo de aminoácido serina no sítio ativo que é essencial para suas atividades catalíticas, pois realiza a hidrólise do substrato (COHEN & OOSTERBAAN, 1963 *apud* DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003; QUINN, 1987).

2.1.1. *Butirilcolinesterase*

A BChE, também conhecida como pseudocolinesterase, colinesterase plasmática e colinesterase inespecífica (CRAIG & STITZEL, 2005), exibe uma ampla distribuição, e pode ser encontrada no fígado, na pele, no cérebro, no músculo liso gastrointestinal, bem como no plasma em forma solúvel (RANG, DALE & RITTER, 2001).

Hidroliza com maior eficiência a butirilcolina e a propionilcolina do que a acetilcolina (MAIN *et al.*, 1974). Além de ésteres de colina, essa enzima catalisa também a hidrólise de uma variedade de outros ésteres: agentes utilizados em anestesia como a procaína, ametocaína, bupivacaína (GALENKO-YAROSHEVSKII, 2003) e o mivacúrio (DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003), e outros compostos como cocaína (GATLEY, 1991; CARMONA *et al.*, 2000), heroína (LOCKRIDGE *et al.*, 1980) e aspirina (MASSON *et al.*, 1998).

Por muito tempo, o principal interesse em se estudar essa enzima estava na sua reação com a succinilcolina, um relaxante muscular utilizado em anestésias. Foi descoberto que a BChE era a principal responsável por sua degradação e que pacientes que apresentavam uma apnéia prolongada possuíam uma variante genética incomum e ineficiente dessa enzima (KALOW & DAVIES, 1958).

A molécula da BChE contém 574 aminoácidos por subunidade e 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 asparaginas (LOCKRIDGE *et al.*, 1987). Acredita-se que a glicosilação participe do dobramento, secreção, estabilidade e liberação das colinesterases. O grande número de sítios glicosilados na BChE parece contribuir com sua longa meia vida, protegendo-a contra a proteólise e aumentando seu tempo de permanência na circulação sanguínea (NACHON *et al.*, 2002).

Arpagaus *et al.* (1991) compararam um fragmento de 423 nucleotídeos localizado no éxon 2 do gene *BCHE* de humanos com o mesmo gene de alguns mamíferos; a identidade nucleotídica foi de 98,8% em macacos, 94,1% em ovelhas, 93,6% em bois, 92,4% em coelhos, 91,7% em suínos, 91,3% em cachorros e 86,3% em camundongos. De acordo com estudos de Lockridge *et al.* (1987), a sequência da butirilcolinesterase humana apresenta 53,3% de identidade com a acetilcolinesterase de *Torpedo californica* e 28% de identidade com a porção carboxi-terminal da tiroglobulina bovina.

O gene *BCHE*, que codifica a enzima BChE, está localizado no cromossomo 3 tanto em humanos (3q26.1-q26.2) quanto em camundongos e, naqueles,

apresenta um comprimento de 64.560 pb e possui 4 éxons e 3 grandes íntrons (GAUGHAN *et al.*, 1991) (Figura 1). O éxon 1 do gene *BCHE* contém seqüências não traduzidas, um tamanho de 149 pb e dois potenciais sítios de iniciação da tradução, nos códons -69 e -47; o éxon 2, de 1.525 pb, contém 83% de seqüência codificadora para a proteína madura, incluindo o N-terminal, a serina do sítio ativo, e um terceiro possível sítio de iniciação, no códon -28; o éxon 3 possui 167 nucleotídeos e o éxon 4, de 604 pb, codifica a porção C-terminal da proteína e a região 3' UTR, na qual foram identificados 2 sinais de poliadenilação, ambos funcionais. O íntron 1 possui um comprimento de 6.272 pb, enquanto os íntrons 2 e 3 possuem 43.205 pb e 12.638 pb, respectivamente (ARPAGAUS *et al.*, 1990; NT_005612, NCBI). Nesse mesmo estudo, os autores sugerem que esse gene está presente em cópia única no genoma humano.

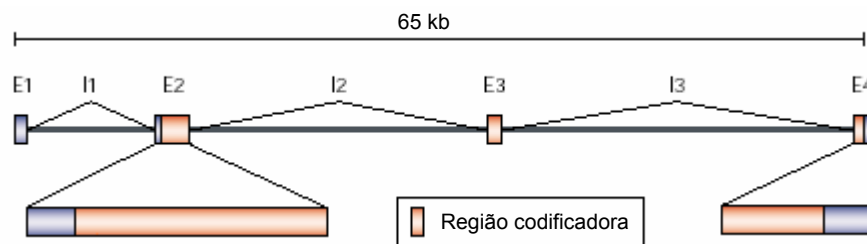


Figura 1. O gene *BCHE*. Está localizado no cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), tem aproximadamente 65 kb e é composto por 4 éxons (E1, E2, E3 e E4) e 3 íntrons (I1, I2 e I3).

Já foram identificadas mais de 65 mutações no gene *BCHE* (SOUZA *et al.*, 2005). Entre elas estão as variantes A (atípica), K, J e H.

A variante “atípica” é originada por uma mutação que provoca a substituição de um ácido aspártico por uma glicina no códon 70. É conhecida por estar relacionada à hipersensibilidade à succinilcolina, e sua freqüência alélica é de 2,0% em Caucasóides (MCGUIRE *et al.*, 1989). Valor semelhante (1,8%) foi encontrado em uma população de euro-descendentes da cidade de Curitiba (MIKAMI *et al.*, 2008).

A variante K, um dos polimorfismos mais comuns, é encontrada em 33% dos Caucasóides e Orientais, e apresenta uma freqüência alélica de 18,4% em euro-descendentes (SOUZA *et al.*, 1998). É originada por uma mutação de ponto no códon 539, que resulta na substituição de uma alanina por uma treonina (BARTELS *et al.*, 1992). A enzima K não apresenta diferenças com a BChE selvagem em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou

formação sérica de tetrâmeros, não apresentando nenhum efeito aparente na estrutura ou atividade da BChE (ALTAMIRANO, BARTELS & LOCKRIDGE, 2000). Tem sido estudada como um fator associado à Doença de Alzheimer de desenvolvimento tardio (MCILROY *et al.*, 2000).

A variante J resulta de uma mutação no códon 497, que altera um ácido glutâmico por uma valina (BARTELS, JAMES & LA DU, 1992) e causa uma diminuição de 66% na quantidade de butirilcolinesterase, talvez por um retardo na síntese ou ainda por uma aceleração da degradação dessa molécula (GARRY *et al.*, 1976). Na variante H, um resíduo de valina no códon 142 é substituído por uma metionina, o que resulta em uma proteína com uma atividade 90% menor que a enzima do tipo selvagem (JENSEN, BARTELS & LA DU, 1992).

Há ainda várias formas mutantes da BChE que possuem atividade inferior a 10% quando comparada com a enzima usual; são chamadas de variantes silenciosas, pois não são capazes de catalisar ésteres de colina (LIDDELL, LEHMANN & SILK, 1962). No entanto, os homozigotos não apresentam qualquer efeito deletério aparente, e seus portadores têm saúde normal, a não ser se forem submetidos a uma cirurgia com succinilcolina como relaxante muscular (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989).

Por muito tempo a função fisiológica da BChE ficou incerta e a observação feita por Primo-Parmo *et al.* (1996) de que indivíduos com a ausência dessa enzima funcional não apresentavam problemas de saúde, só levava a crer que ela era uma enzima “não-essencial”. Entretanto, estudos recentes sugerem que ela tenha uma participação nos mais diversos processos fisiológicos.

A BChE está presente em regiões do cérebro não relacionadas com a AChE, como por exemplo nas células endoteliais dos capilares, nas células da glia e nos neurônios (GRAYBIEL & RAGSDALE, 1982). Li *et al.* (2000) sugerem que ela possua uma função fisiológica natural em regiões específicas, mas que de uma maneira geral, ela atua como um substituto da AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta enzima está ausente ou com sua atividade comprometida. Nos estudos de Mesulam *et al.* (2002), Girard *et al.* (2007) e Duysen *et al.* (2007), nos quais foram utilizados camundongos *knockout* para a AChE, foi demonstrado que a BChE, além de ter potencial para substituir a AChE, sendo essencial para a sobrevivência desses camundongos, ainda pode ter uma função constitutiva na hidrólise da acetilcolina no cérebro normal e nas junções

neuromusculares, nas quais atuaria como um protetor dos nervos terminais contra o excesso desse neurotransmissor.

Duysen *et al.* (2007) também verificaram essa função fisiológica da BChE - hidrólise da acetilcolina *in vivo* - em camundongos *knockout* para a própria BChE e em humanos. Foi observado que animais BChE -/- morriam após a administração de uma droga inibidora específica da AChE, o que não ocorre com animais do tipo selvagem, e concluiu-se que o fato era decorrente da falta do *backup* normalmente realizado pela BChE.

Em humanos, observou-se que pacientes com deficiência da enzima BChE apresentaram um atraso no início do desenvolvimento da Doença de Alzheimer, e que seu declínio cognitivo era mais lento do que em pacientes com níveis normais dessa colinesterase. Essa observação pode ser explicada pela hipótese de que os cérebros dos pacientes com a deficiência de BChE são capazes de manter os níveis de acetilcolina normais e, conseqüentemente, uma função cognitiva normal por um longo período, por haver uma menor hidrólise desse neurotransmissor.

Tanto a BChE quanto a AChE se expressam durante o desenvolvimento embrionário. Há evidências de que a BChE está presente transitoriamente em algumas células embrionárias, nas quais ela pode estar sendo substituída, em alguns casos, pela AChE. Isso sugere uma função para a BChE como uma acetilcolinesterase embrionária e sugere uma complementariedade no papel das duas enzimas (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989). Essa expressão transitória se dá em uma grande população de neurônios e também em células não neuronais, e tem sido interpretada como uma evidência da participação dessa enzima no desenvolvimento do sistema nervoso, seja pela sua atividade enzimática ou pela sua capacidade de regular outras proteínas (DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003).

Em estudos de Layer & Sporns (1987), realizados com embriões de galinha, foi observado que, tanto na retina quanto no cérebro, a diminuição da proliferação celular é seguida pela diminuição da quantidade de BChE. Os mesmos autores também observaram que a BChE é expressa logo no início e durante a mitose, enquanto a AChE é expressa em torno de 11 horas após a divisão celular. Sugere-se, então, a participação dessa enzima na regulação da proliferação celular e também na expressão da AChE, além da participação desta última no processo de diferenciação celular (LAYER, 1991; LAYER & WILLBOLD, 1995).

A BChE possui ainda uma importância toxicológica e farmacológica, pois detoxifica compostos anticolinesterásicos e várias drogas, além de proteger contra o envenenamento por organofosforados (BROOMFIELD *et al.*, 1991; SCHWARZ *et al.*, 1995; COKUGRAS, 2003). Estudos mostram que ela pode ser a primeira linha de defesa do organismo contra substâncias tóxicas inaladas ou ingeridas (JBILO *et al.*, 1994). Também parece estar envolvida no metabolismo de lipoproteínas (KUTTY & PAYNE, 1994), manutenção da mielina (EARL & THOMPSON, 1952), e no processamento da proteína precursora amilóide (BALASUBRAMANIAN, 2001).

Além da hidrólise de ésteres, é provável que a BChE apresente uma atividade de aril acilamidase, que catalisa a hidrólise de acil amidas das aminas aromáticas (GEORGE & BALASUBRAMANIAN, 1981). Essa atividade não possui função fisiológica conhecida, mas proporciona a hidrólise do substrato sintético o-nitroacetanilido em o-nitroanilido e acetato (COKUGRAS, 2003), e é inibida pelo neurotransmissor serotonina e estimulada pelo aminoácido tiramina (GEORGE & BALASUBRAMANIAN, 1981; BALASUBRAMANIAN & BHANUMATHY, 1993).

Os níveis de BChE no soro são influenciados por diversas condições clínicas e estados fisiológicos (ROBERTSON, 1966). Edwards & Brimijoin (1982) realizaram estudos com ratos hipofisectomizados e observaram que a AChE tem uma regulação tecido específica, enquanto a BChE depende de um tipo de regulação homeostática por todo o corpo. Alterações na atividade da BChE já foram descritas em casos de anemia severa (FABER, 1943), em deficiência renal (SIMON *et al.*, 1969), na gravidez (ROBERTSON, 1966), em disfunções hepáticas (HADA *et al.*, 1988) e em síndromes metabólicas e obesidade (ALCÂNTARA *et al.*, 2005). Parece também ter uma diferença de atividade de acordo com o sexo e a idade do indivíduo. Foi verificado que até os 60 anos a atividade da BChE é maior em homens do que em mulheres e que, nestas, após a menopausa a atividade aumenta, equiparando-se à dos homens. Em mulheres, além do ciclo menstrual, a atividade da colinesterase plasmática ainda é influenciada pelo uso de pílula anticoncepcional, o qual leva à uma diminuição da mesma (SIDELL & KAMINSKIS, 1975; FAIRBROTHER *et al.*, 1989).

2.1.2. Acetilcolinesterase

A AChE é uma das enzimas cruciais do sistema nervoso central e periférico. Ela hidrolisa e inativa a acetilcolina, neurotransmissor de fundamental importância,

comum a muitas sinapses no sistema nervoso de todos os mamíferos. Também é conhecida como colinesterase verdadeira, específica ou genuína, e pode ser encontrada nos eritrócitos, nas porções terminais dos nervos, pulmões, baço e em todos os compartimentos do cérebro (PATOCKA, KUCA & JUN, 2004). A falta de AChE funcional leva ao acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, o que resulta em paralisia muscular, crise convulsiva e morte por asfixia (RAVEH *et al.*, 1993).

O monômero dessa enzima é uma proteína alfa/beta (12 folhas β -pregueadas envoltas por 14 α -hélices) que contém 537 aminoácidos e o gene que a codifica (*ACHE*) está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q22) em humanos (EHRlich *et al.*, 1992; GETMAN *et al.*, 1992) e no cromossomo 5 em camundongos (RACHINSKY *et al.*, 1992). O gene *ACHE* dos mamíferos contém 6 éxons (Figura 2). O éxon 1 contém a região 5' não traduzida, e a fase de leitura aberta (ORF) começa no éxon 2.

O rearranjo dos éxons 5 e 6 regula a formação de certas isoformas moleculares da AChE (MAULET *et al.*, 1990). De acordo com Soreq & Seidman (2001), existem três variantes distintas da AChE – a sináptica (S), a eritrocítica (E) e a “readthrough” (R) – que são produzidas por *splicing* alternativo (Figura 2) e possuem diferença na seqüência carboxi-terminal, a qual é responsável pela organização homóloga em oligômeros e também pela organização heteróloga, com subunidades não catalíticas, as quais vão direcionar e determinar a localização da proteína. A AChE-S constitui a principal enzima multimérica no cérebro e no músculo; a AChE-R é a forma solúvel e monomérica, está presente em células embrionárias e tumorais e é induzida sob estresse psicológico, químico e físico, enquanto a AChE-E geralmente encontra-se na forma de dímeros em associação com a membrana das células vermelhas do sangue (GRISARU *et al.*, 1999).

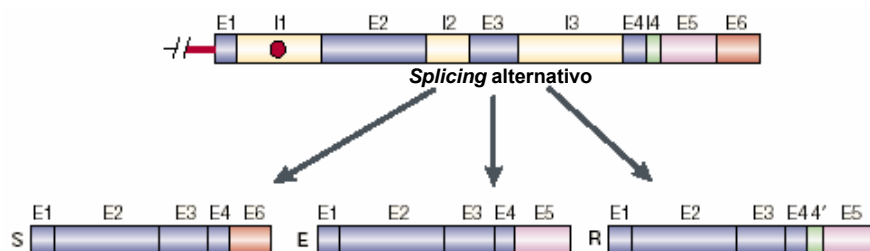


Figura 2. O gene *ACHE* e seus RNAs mensageiros alternativos. Está localizado na região 7q22 e, por rearranjo dos éxons 5 e 6, produz as variantes S (sináptica), E (eritrocítica) e R (*readthrough*).

O sítio ativo é composto de dois subsítios: o esterásico, o qual contém a tríade catalítica (Ser 200, His 440 e Glu 327), responsável pelas funções catalíticas da enzima, e o aniônico que é carregado negativamente e acomoda o grupo quaternário da acetilcolina (SUSSMAN *et al.*, 1991). Surpreendentemente, o sítio ativo esterásico está localizado no fundo de uma fenda profunda e estreita dentro da proteína, fato inesperado tendo em vista sua extraordinária rapidez nas reações catalíticas (SOREQ & SEIDMAN, 2001). O sítio aniônico, por sua vez, encontra-se na superfície da enzima e parece estar envolvido com a inibição alostérica da mesma, e ainda, na associação de proteínas heterólogas que ocorre durante a sinaptogênese ou na neurodegeneração (BOURNE *et al.*, 2003).

A AChE associada com o sistema colinérgico é encontrada no cérebro e nas junções neuromusculares e, recentemente, observou-se que também desempenha um papel indispensável na formação e manutenção da estrutura da retina (BYTYQI *et al.*, 2004). Entretanto, o seu papel ainda não está claro em regiões onde a acetilcolina não está presente, como em células hematopoéticas, osteogênicas e outras neoplásicas (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Appleyard (1992) sugere que a AChE possui várias propriedades, além da sua atividade colinesterásica, que possam afetar a função neuronal, incluindo as habilidades de influenciar a condutividade de certas membranas, aumentar a transmissão via aminoácidos excitatórios e hidrolisar peptídeos.

Outros estudos também indicam que a AChE possui uma atividade extra sináptica e não-colinérgica. Fitzpatrick-Mcelligott & Stent (1981) observaram que a presença da AChE precede a formação de qualquer tecido nervoso. Bigbee *et al.* (1999) demonstraram um papel morfogênico e ainda sugerem uma função de adesão celular dessa enzima durante o desenvolvimento do sistema neural. Ben Aziz-Aloya *et al.* (1993) observaram que a região promotora do gene *ACHE* em humanos contém sítios ligantes para fatores de crescimento associados com o controle da proliferação celular e crescimento. Também se sugere a sua participação no processo de diferenciação celular (LAYER, 1991) como já mencionado; no desenvolvimento muscular (BETZ, BOURGEOIS & CHANGEUX, 1980); na hematopoiese, regulando a proliferação de células multipotentes e na apoptose de células submetidas à diferenciação em eritrócitos ou mielócitos (STEPHENSON *et al.*, 1996) e no acúmulo de placas amilóides na Doença de Alzheimer (WRIGHT, GEULA & MESULAM, 1993).

Já foi verificada a presença das colinesterases em organismos primitivos que não possuem sistema nervoso, o que sugere que estas enzimas (e talvez a acetilcolina) tenham precedido o desenvolvimento desse sistema, além de ser uma evidência para as ações não-colinérgicas das ChEs (SMALL, MICHAELSON & SBERNA, 1996). De acordo com Pantin (1956, citado por SMALL, MICHAELSON & SBERNA, 1996), o processo evolutivo pode ter adaptado a AChE e a acetilcolina a funcionarem na neurotransmissão em células neuronais.

2.2 Câncer de Mama

Câncer é definido como um grupo de doenças que se caracterizam pelo crescimento e proliferação incontroláveis de células anormais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Desenvolve-se a partir do acúmulo de mutações genéticas e/ou alterações epigenéticas que modificam a estrutura ou a função de genes importantes no controle da homeostasia celular, como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Estes regulam direta ou indiretamente os mecanismos celulares de controle de proliferação, morte celular e integridade genômica (HUNT *et al.*, 2001; KVITKO, 2003).

Os proto-oncogenes induzem e regulam positivamente o crescimento e a divisão celular em resposta a estímulos fisiológicos. Ocorrendo mutações em um ou poucos códons críticos desses genes pode ser gerado um produto gênico ativado que causa a transformação celular e, conseqüentemente, a proliferação celular contínua e independente de estímulos externos. Geralmente, basta que um dos alelos esteja mutado para que o fenótipo neoplásico se manifeste. As formas modificadas dos proto-oncogenes são denominadas oncogenes (BISHOP, 1991; AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Os genes supressores de tumor inibem o crescimento celular, regulando negativamente a proliferação das células ou positivamente a apoptose e, se ambos os alelos forem inativados, podem desencadear crescimento celular aberrante, contribuindo para o desenvolvimento do tumor (MARX, 1993; AMENDOLA & VIEIRA, 2005).

A freqüência das neoplasias malignas vem aumentando à medida que ocorre o controle progressivo de outras doenças e o conseqüente envelhecimento populacional. Segundo Parkin (2001), só no ano de 2000 surgiram dez milhões de casos novos no mundo, sendo os mais comuns o de pulmão (1,2 milhões), o de mama (1,05 milhões) e o coloretal (945.000). De acordo com os indicadores de

mortalidade do Ministério da Saúde, o câncer representa a segunda mais importante causa de morte na população brasileira e, no período de 2005 representou 16,30% dos óbitos nesse grupo populacional, após as doenças cardiovasculares (31,50%).

O câncer de mama é um dos tipos mais freqüente de neoplasia. No Brasil, é o segundo maior responsável pela mortalidade feminina, sendo que em 2000, foram registradas 8.390 mortes decorrentes desse tipo de câncer (ZAGO *et al.*, 2005). De acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2008 e 2009 (INCA/MS, 2007), o câncer de mama será o segundo mais incidente entre as mulheres, com 49.400 casos, sendo que a maior parte deles concentrar-se-á nas regiões Sudeste (28.430) e Sul (9.500). No Paraná, estima-se uma taxa de 56,16 casos novos para cada 100.000 mulheres. Nos Estados Unidos, calculou-se o surgimento de 178.480 novos casos entre as mulheres, e 2.030 novos casos entre os homens durante o ano de 2007 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007).

O câncer de mama ocorre quando células de algumas estruturas mamárias, principalmente dos lóbulos e dos ductos, por alguma razão ainda não esclarecida, começam a se dividir de forma anormal e incontrolável, e formam uma massa de tecido independente, o tumor (DeFELICE, 2002). É uma doença potencialmente letal e sua incidência tem aumentando regularmente desde 1950, mais significativamente em mulheres em pós-menopausa, embora também ocorra em jovens com idade em torno dos vinte anos. Nestes casos, os tumores tendem a ser mais agressivos, e as pacientes normalmente têm um prognóstico menos favorável (ZIMMERMAN, 2004).

O prognóstico do câncer de mama está relacionado a uma grande variedade de fatores clínicos e patológicos tais como, existência de metástases axilares, tipo e tamanho do tumor, grau histológico, presença ou ausência de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e amplificação ou hiperexpressão do gene *ERBB2* (BOGLIOLO, 2006). Este gene codifica uma tirosina quinase transmembrana que apresenta uma certa homologia com receptores de fatores de crescimento epiteliais. Ainda não se conhece sua exata função mas, baseando-se nessa homologia, sugere-se que essa quinase atue como um receptor celular para um fator de crescimento ainda desconhecido (CARR *et al.*, 2000). Pacientes com câncer de mama que apresentam o gene *ERBB2* amplificado ou superexpresso estão sujeitas a um pior prognóstico, como por exemplo, tumores indiferenciados (grau III), presença de linfonodos axilares e diminuição da expressão dos receptores

hormonais. Todas estas características estão associadas a um maior risco de recorrência da doença e também de morte (SLAMON *et al.*, 1987).

Vários fatores que aumentam o risco de desenvolver a doença têm sido identificados. O mais importante deles é a idade: a cada década da vida o risco aumenta consideravelmente. Uma mulher que não apresenta outro fator de risco tem apenas 2% de chance de desenvolver a doença antes dos 50 anos. Entretanto, se ela passar dos 85 anos o risco é de 12,5% (ZIMMERMAN, 2004). Esse aumento se dá principalmente nas áreas de maior incidência. A diferença observada na incidência em diferentes países reflete variações nos riscos de vida modificáveis, tais como dieta, vida sedentária, obesidade e a ingestão de álcool em excesso. Em estudos epidemiológicos ficou evidente a associação entre incidência do câncer de mama nos países ocidentais e seu estilo de vida, com dieta hipercalórica, rica em lipídeos e gordura animal, associada à falta de atividade física (BOGLIOLO, 2006). A exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos também pode ser considerada um fator de risco (INCA/MS, 2008).

Outros importantes fatores de risco incluem a idade da menarca, número de gestações, se amamentou ou não os filhos, e a idade da menopausa. Esses fatores sugerem uma forte influência dos hormônios, especialmente os estrógenos, no desenvolvimento dessa neoplasia. De acordo com Mitchell *et al.* (2006) os metabólitos do estrogênio podem causar mutações ou gerar radicais livres que danificam o DNA. Além disso, os estrogênios também podem promover a proliferação das lesões pré-malignas, bem como dos cânceres. O uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) por muitos anos também aumenta o risco (ZIMMERMAN, 2004).

Outro fator de risco importante, associado ao aumento da susceptibilidade ao câncer de mama é a história familiar, especialmente se uma ou mais consangüíneas de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade. Corresponde a aproximadamente 10% do total de casos de cânceres de mama e acredita-se que 30% das mulheres jovens que desenvolvem essa neoplasia apresentam um padrão genético de predisposição a ela (DUFLOTH *et al.*, 2005).

A predisposição genética ao câncer de mama resulta principalmente de alterações nos genes de susceptibilidade *BRCA1* ou *BRCA2* (cerca de 90% dos casos). Ambos são considerados genes supressores de tumor e têm papel importante na reparação de danos do DNA e controle da proliferação celular. O

BRCA1 localiza-se na região cromossômica 17q21; indivíduos com mutação nesse gene têm de 50 a 80% de chance de desenvolver câncer de mama aos 70 anos (o risco da população normal é de 12%) e de 40 a 50% de chance de desenvolver câncer de ovário, também aos 70 anos (o risco populacional é 1,3%). O *BRCA2* localiza-se na região cromossômica 13q12-13; mutações constitucionais nesse gene aumentam sensivelmente o risco de desenvolver carcinoma de mama, tanto no sexo feminino (50 a 70% aos 70 anos) como no masculino (5 a 7% - o risco da população normal é de 0,02%) (BOGLIOLO, 2006).

Mutações germinativas nos genes *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHECK2* (genes supressores de tumor que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular e/ou com funções no reparo do DNA) e *HMMR* (interage com o *BRCA1* aumentando a instabilidade genética e interferindo no ciclo celular) também estão associadas ao carcinoma de mama hereditário (BOGLIOLO, 2006; PUJANA *et al.*, 2007; OMIM).

Existe uma variação regional na incidência e mortalidade de câncer de mama no Brasil. De acordo com dados de Filho & Moncau (2002), entre 1980 e 1995, a mortalidade por câncer de mama feminino aumentou em todas as regiões, mas o risco de morte no Sul e Sudeste foi pelo menos duas vezes o de outras regiões. Entre os inúmeros fatores de risco, cujas diferenças poderiam ser assinaladas para explicar as diferenças geográficas de mortalidade, pode-se destacar o fato de as mulheres do Norte, Nordeste e Centro-Oeste registrarem maior número médio de filhos e com tendência a tê-los em idade mais precoce. Esta característica, aliada à estrutura social destas regiões, poderia estar agindo como um fator de proteção para o câncer de mama nestas localidades. Ao contrário, as mulheres das regiões Sul e Sudeste, urbanizadas em maior proporção, em geral, iniciam gestações em idade mais avançada.

2.3 Colinesterases e o Câncer

A presença das colinesterases na embriogênese e sua participação no controle da proliferação e diferenciação celular, já demonstrado em uma série de estudos (BETZ, BOURGEOIS & CHANGEUX, 1980; FITZPATRICK-MCELLIGOTT & STENT, 1981; LAYER & SPORNS, 1987; LAYER, 1991; LAYER & WILLBOLD, 1995; STEPHENSON *et al.*, 1996; LAYER, 1996; BIGBEE *et al.*, 1999), aliado à constatação de que várias células tumorais que não apresentam nenhuma atividade elétrica detectável como resposta à acetilcolina, expressam colinesterases e

receptores para esse neurotransmissor (DREWS, 1975 *apud* SOREQ, LAPIDOT & ZAKUT, 1991), sugerem uma possível influência dessas enzimas no processo de tumorigênese.

Essa hipótese é corroborada por vários estudos, os quais mostram que os genes das colinesterases estão estruturalmente alterados, ou estão se expressando de maneira aberrante em uma série de tipos tumorais. No entanto, não há um comportamento pré-estabelecido para essas enzimas em cânceres, pois já foram observadas tanto um aumento quanto uma diminuição de suas atividades em diferentes tipos de tumores. Vidal (2005) sugere que essa variação esteja relacionada com o tipo celular em que se originou o tumor.

A alteração desses genes em células neoplásicas pode ocorrer devido à função biológica de seus produtos protéicos ou pode simplesmente ser um evento adicional, que pode ocorrer por esses genes estarem localizados em regiões mais instáveis do cromossomo e, portanto, mais propensas a sofrerem alterações (SOREQ, LAPIDOT-LIFSON & ZAKUT, 1991).

Kaniaris *et al.* (1979) compararam a atividade da butirilcolinesterase de pacientes com diferentes tipos de carcinoma e indivíduos saudáveis, e observaram que ela foi significativamente menor nos pacientes com câncer do que nos controles. Na presença de metástases essa atividade era ainda menor, e também variava conforme a localização da lesão primária: 19,4% das pacientes com câncer de mama tinham uma atividade da enzima menor que 3 KU/L, comparado a 79% de pacientes com câncer de pulmão, 44% com carcinoma no trato digestivo e 56% naqueles com tumores gastrointestinais, enquanto os indivíduos controles apresentaram uma média de 4,85 KU/L (os valores normais para essa enzima estão entre 3 e 9 KU/L). Em estudo semelhante, Loiselet, Sabbagh & Srouji (1968) obtiveram o mesmo resultado: uma atividade da butirilcolinesterase bastante inferior nos pacientes com neoplasia em relação à encontrada nos indivíduos controles.

Montenegro *et al.* (2005) observaram que em casos de câncer de cólon há uma diminuição tanto na atividade da AChE quanto na da BChE, e que a quantidade de tetrâmeros da AChE é diminuída em favor dos monômeros e dímeros no intestino, e concluem que essa diferença pode ter uma influência no desenvolvimento da doença. Foi observada também uma diminuição da atividade da AChE em casos de câncer de pulmão (MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 2005 e 2006).

Nesses casos, entretanto, os padrões de oligomerização não foram afetados pela neoplasia.

Dados obtidos por SONG *et al.* (2003) demonstraram que a acetilcolina estimula o crescimento das células em carcinomas de pulmão. A queda da atividade da AChE e o conseqüente aumento da concentração de acetilcolina disponível, pode levar a uma superestimulação da sinalização colinérgica e aumentar a proliferação celular (MARTINEZ-MORENO *et al.*, 2006).

Com relação aos cânceres que acometem o sistema nervoso, já foi reportada a superexpressão da AChE em gliomas (VIDAL, 2005), mutações no gene da BChE em células de glioblastomas e neuroblastomas (GNATT *et al.*, 1990), ocorrência de oligomeros aberrantes constituídos de subunidades da AChE e da BChE em astrocitomas e oligodendrogliomas (GARCÍA-AYLLÓN *et al.*, 2001), associação entre a mudança na composição das variantes da AChE e aumento do grau de malignidade do tumor em astrocitomas (PERRY *et al.*, 2002) e outras alterações das colinesterases em meningiomas (SAEZ-VALERO & VIDAL, 1996). Barbosa *et al.* (2001) sugerem que haja uma relação entre os níveis de BChE e a taxa de crescimento celular em tumores cerebrais, pois em seus estudos ficou claro que a quantidade dessa enzima aumentava conforme aumentava a malignidade do tumor. Jonhson & Moore (2000) demonstraram que a AChE induz a diferenciação morfológica em células de neuroblastoma, indicando uma importância dessa enzima na adesão celular e no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário.

Foi demonstrada uma significativa co-amplificação dos genes *ACHE* e *BCHE* em carcinoma primário de ovário (ZAKUT *et al.*, 1990) e em células do sangue periférico de pacientes com leucemia e outras anormalidades hematopoéticas, tal como a trombocitopenia associada ao lúpus eritematoso (LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989; ZAKUT *et al.*, 1992).

A semelhança estrutural entre as colinesterases e a coenzima ativadora de ciclinas, a qual serve como substrato para a CDC2, dá suporte ao possível envolvimento das colinesterases no processo de replicação celular. A CDC2 é uma subunidade catalítica de um complexo de proteína quinase, o qual induz o início do processo mitótico, e é universal entre os eucariotos (OMIN, 2008). Lapidot-Linfson *et al.* (1992) clonaram um cDNA que codifica uma proteína de 418 aminoácidos homóloga à proteína quinase *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe*, e que apresenta uma identidade de 34 a 42% com a seqüência da CDC2 humana e com a

da CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae*, e a denominaram de CHED (cholinesterase-related cell division controller) por apresentar uma homologia de 248 nucleotídeos com o cDNA da BChE. Utilizando um mRNA antisense (AS-CHED), os autores observaram que a diminuição da expressão da proteína CHED inibiu o crescimento de megacariócitos na medula óssea de camundongos. Um efeito semelhante foi observado quando utilizou-se um mRNA antisense para o cDNA codificador da BChE. Com isso, os autores sugerem que haja uma relação entre a sinalização colinérgica e a divisão celular e que ela seja mediada por proteínas CDC. Supõe-se que a co-amplificação da atividade das colinesterases estimule as proteínas quinases, as quais induzem a fase S do ciclo celular, mantendo as células tumorais em mitose e perpetuando a replicação celular (SOREQ, LAPIDOT-LIFSON & ZAKUT, 1991; BARBOSA *et al.*, 2001).

Já foi relatada também uma amplificação da região 3q em células de câncer de pulmão - nas quais o gene *BCHE* foi um dos mais freqüentemente amplificados (BRASS *et al.*, 1997; YOKOI *et al.*, 2003) -, em cânceres de próstata (JUNG *et al.*, 2006) e em cânceres de cabeça e pescoço (HIBI *et al.*, 2000). Rearranjos e outras anormalidades desse mesmo segmento cromossômico já foram associados à quantidade alterada de plaquetas, anormalidade na morfologia de megacariócitos e retardo na melhora de pacientes com síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia mielóide aguda (AML) e leucemia mielóide crônica (CML). A maioria dos casos apresentou quebras nas regiões 3q21 e 3q26, freqüentemente associadas com a monossomia do cromossomo 7 e trombocitopenia anormal (HORSMAN, GASCOYNE & BARNETT, 1995).

A região na qual está localizado o gene *ACHE* (7q22), por sua vez, também está constantemente envolvida em quebras nas leucemias. Stephenson *et al.* (1996) acreditam que esse achado reforce a possibilidade de que a perda de função do gene *ACHE* aumente a proliferação celular e diminua a maturação de células hematopoéticas específicas. Alguns autores sugerem que a AChE age como um supressor de tumor na hematopoiese, reduzindo a proliferação de células multipotentes relacionadas à formação de eritrócitos e megacariócitos e a produção de macrófagos, e ainda promovendo a apoptose de células progenitoras. Esses achados podem explicar a associação da alteração da expressão da AChE com a leucemia (SOREQ *et al.*, 1994).

RUIZ-ESPEJO *et al.* (2002; 2003) observaram que a atividade das colinesterases também está alterada nas neoplasias de mama: a AChE tem uma atividade quase duas vezes maior no tecido tumoral, enquanto a da BChE diminui em 65%. Já em linfonodos invadidos por células cancerosas metastásicas da mama, foi observado que a atividade da AChE está diminuída e a da BChE praticamente inalterada. As formas da AChE são bastante modificadas pela metástase, quando ocorrem apenas monômeros e dímeros, e as formas assimétricas estão ausentes.

Ainda nesse tipo de câncer, foi observada uma mudança no padrão de glicosilação da AChE (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002). Uma glicosilação aberrante dessa enzima também já foi relatada em carcinomas de pulmão (MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 2006) e outros tecidos cancerosos (DWEK & BROOKS, 2004). Sabe-se que o padrão de glicosilação das colinesterases é altamente regulado. Sugere-se que os epítomos podem modular as propriedades de adesão das glicoproteínas, e também, indiretamente, têm um efeito na atividade da enzima, estimulando ou inibindo suas funções. Além disso, também parece afetar a polimerização da AChE nos eritrócitos humanos (é maior em G2 do que em G4), e definir a distribuição das moléculas da butirilcolinesterase em tecidos específicos (WEIKERT *et al.*, 1994; LAYER, 1996).

Recentemente, foi identificado um pequeno peptídeo (AEFHRWSSYMVHWK) na porção C-terminal da molécula da AChE, o qual pode ser o responsável por pelo menos algumas das funções não-catalíticas da enzima, como por exemplo a potencialização do crescimento neuronal. Alguns autores sugerem que este peptídeo tenha alguma atividade no câncer de mama e possa acentuar o comportamento metastásico das células. Segundo Onganer *et al.* (2006) esse peptídeo apresenta uma ação seletiva, e cálcio dependente, sobre a linhagem celular metastásica de câncer de mama MDA-MB-231, reduzindo significativamente a atividade endocítica basal de suas membranas celulares. Os comportamentos dessa célula metastásica que são influenciados pelo cálcio incluem a apoptose, a mobilidade e a expressão gênica. O fluxo de cálcio em conjunto com a ação do AChE-peptídeo em um sítio alostérico, pode induzir a expressão da AChE, e com isso liberar mais AChE-peptídeo. A metástase pode ser potencializada ou mantida, portanto, por um processo de *feedback* positivo, envolvendo um receptor e uma enzima relacionados à transmissão neuromuscular. Por esse motivo, outra ação

não-catalítica da AChE poderia ser uma possível função no processo metastático em câncer de mama.

Inúmeros trabalhos relatam as possíveis alterações genéticas associadas ao desenvolvimento e à progressão do câncer de mama. Muitos deles têm identificado ampliações em regiões cromossômicas que não coincidem com a localização dos clássicos oncogenes que atuam nesse tipo de neoplasia. As regiões nas quais são encontrados os genes *BCHE* e *ACHE* têm aparecido amplificadas com bastante frequência nessa neoplasia (BUERGER *et al.*, 1999; FOROZAN *et al.*, 2000; BURDALL *et al.*, 2003). Pinto *et al.* (2006) sugerem que a região 7q seja um potencial sítio candidato para a localização de oncogenes, visto que foi encontrado amplificado com uma certa frequência em carcinomas mamários.

Alguns estudos relacionam ainda a proliferação de células malignas com a exposição a pesticidas organofosforados, os quais são inibidores das colinesterases. Prody *et al.* (1989) observaram que um dos filhos e um dos netos de uma família que esteve exposta por tempo prolongado a um organofosforado empregado na agricultura apresentavam o gene *BCHE* amplificado e codificando uma enzima defeituosa. Cabello *et al.* (2001), em estudos com ratos, demonstraram que este pesticida agrícola induz alterações no epitélio da glândula mamária e influencia o processo de carcinogênese nesse tecido por meio do aumento da estimulação colinérgica, o qual, por sua vez, ocorre devido à inibição da enzima acetilcolinesterase. Calaf *et al.* (2007), em estudo semelhante, observaram que a eserina, um inibidor da AChE, é capaz de induzir a carcinogênese no epitélio das glândulas mamárias de ratos. Brown *et al.* (1990) afirmam que a exposição a inseticidas inibidores de AChE aumenta o risco de desenvolver leucemias.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Verificar se há alteração estrutural dos genes das colinesterases em tumores mamários.

3.2 *Objetivo Específico*

Investigar se há amplificação ou deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* em tecido mamário tumoral com relação ao tecido normal através de PCR em tempo real.

4. MATERIAL E METODOLOGIA

4.1 Caracterização da Amostra

Este estudo foi realizado com fragmentos de tumores de mama e com amostras de sangue periférico (as quais funcionaram como controle) já coletados pela equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, de 101 pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná. Todavia, algumas amostras apresentaram problemas na amplificação e foram descartadas, e outras foram consideradas com ressalva, por apresentarem uma cinética de amplificação um pouco diferente. Essas exclusões resultaram em dois grupos amostrais diferentes: um com 55 pacientes e outro, no qual não se consideraram as amostras com comportamento diferente, com 42 pacientes. As pacientes tinham idade média de $57,09 \pm 14,02$ anos e mediana de 55 anos.

Na Tabela 1 estão relacionadas as características clínico-histopatológicas dessas pacientes. Como pode ser observado, a grande maioria (78,18%) era portadora de carcinoma mamário do tipo ductal. Os tipos lobular e tubular correspondem a 5,45% e a 3,64%, respectivamente. Carcinoma medular, carcinomas mistos (ductal e lobular) e associados a outras doenças, como a Doença de Paget, por exemplo, foram agrupados na categoria “outros”. Não se conseguiu obter todos os dados de todas as pacientes, e por esse motivo cada variável da tabela possui um item denominado SI, que corresponde à quantidade de pacientes sem informação para aquela característica.

Cada doadora recebeu um informativo, no qual constam os objetivos da pesquisa e os procedimentos aos quais seria submetida, e um formulário para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As pacientes participantes responderam ainda a um questionário pessoal.

Tabela 1. Dados clínico-histopatológicos das 55 pacientes.

IDADE			PATOLOGIA		
30 45	8	14,55%	Carcinoma Ductal	43	78,18%
45 60	20	36,36%	Carcinoma Lobular	3	5,45%
60 75	9	16,36%	Carcinoma Tubular	2	3,64%
75 90	6	10,91%	Outros	7	12,73%
SI	12	21,82%			
IDADE MENARCA			TAMANHO TUMOR (mm)		
9 11	1	1,82%	10 28	11	20,00%
11 13	11	20,00%	28 43	15	27,27%
13 15	14	25,45%	43 68	9	16,36%
15 17	5	9,09%	68 – 83	3	5,45%
SI	24	43,64%	SI	17	30,91%
IDADE MENOPAUSA			METÁSTASE NO LINFONODO		
40 50	10	18,18%	Presente	23	41,82%
50 60	19	34,55%	Ausente	16	29,09%
SI	26	47,27%	SI	16	29,09%
IDADE 1ª GRAVIDEZ			GRAU HISTOLÓGICO		
20 25	11	20,00%	I	5	9,09%
25 30	5	9,09%	II	31	56,36%
30 – 35	2	3,64%	III	13	23,64%
SI	37	67,27%	SI	6	10,91%
PÍLULA ANTICONCEPCIONAL			RECEPTORES HORMONAIIS		
Sim	10	18,18%	ER		
Não	14	25,45%	Presente	25	45,45%
SI	31	56,36%	Ausente	5	9,09%
			SI	25	45,45%
Nº FILHOS			PR		
0	4	7,27%	Presente	20	36,36%
1	4	7,27%	Ausente	8	14,55%
2	8	14,55%	SI	27	49,09%
3	13	23,64%	ERBB2		
≥ 4	4	7,27%	Inalterado	19	34,55%
SI	22	40,00%	Amplificado	7	12,73%
			SI	29	52,73%
ETNIA			FUMANTE		
Euro-descendente	28	50,91%	Sim	2	3,64%
Afro-descendente	1	1,82%	Não	16	29,09%
SI	26	47,27%	SI	37	67,27%

SI = Sem Informação

ER = Receptor de Estrogênio

PR = Receptor de Progesterona

I = Bem diferenciado e com crescimento lento

II = Moderadamente diferenciado

III = Indiferenciado e com alta proliferação

4.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

Foram coletados cerca de 10 ml de sangue periférico de cada paciente, por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. O material foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, onde foram mantidos a 4° C até o momento do processamento.

Já as amostras do tecido tumoral foram removidas cirurgicamente, avaliadas por um patologista para a confirmação da malignidade e devidamente acondicionadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C) para posterior extração do DNA no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR.

A classificação histopatológica foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela classificação internacional de tumores (WHO) e o estadiamento clínico foi determinado de acordo com o estadiamento TNM do câncer.

4.3 Extração do DNA Sangüíneo

O DNA do sangue periférico foi extraído pelo método *salting out*, segundo Bignon & Fernandez-Viña (1997), com modificações. Esta técnica permite a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e precipitação do DNA com etanol.

Cerca de 10 ml de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10 X concentrada: 12,1 g de Tris, 110,2 g de MgCl₂, 5,8 g de NaCl) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo foi repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a 60° C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5 X (Invitrogen), 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura. Em seguida, foi adicionado 100 µl de solução saturada de NaCl (6M) para a precipitação protéica, aproveitando-se somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, foi realizada a precipitação do DNA com a adição de 700 µl de etanol. Ao final do processo a amostra de DNA foi

ressuspendida em 50 μ l de água ultra-pura e armazenada a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

4.4 Extração de DNA do Tecido Tumoral

Após ser descongelado, o tecido tumoral foi fragmentado com o auxílio de tesouras, pinças e bisturis estéreis. Para a obtenção de DNA de alto peso molecular, seguiu-se o protocolo de extração manual pelo método de Fenol-Clorofórmio.

Os fragmentos do tecido tumoral foram colocados em um tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 80 μ L de tampão da proteinase K 5 X, 40 μ L de proteinase K (10 mg/mL), 20 μ L de SDS 20% e 240 μ L de água ultra-pura, e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60° C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Na seqüência, foram adicionados 500 μ L de fenol saturado pH 8,0 e 400 μ L de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O tubo, então, foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados a ele 50 μ L de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Em caso de precipitação de pouco DNA, a amostra foi incubada a -20° C por uma hora. Esse novo tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Logo após, foram adicionados 500 μ L de etanol 70% e o tubo foi invertido gentilmente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo foi colocado em bloco de aquecimento a 55° C por 10 minutos para que o DNA secasse.

A amostra de DNA foi então ressuspendida em 30 a 50 μ L de água ultra-pura e retornou ao bloco de aquecimento a 95° C por 10 minutos, para que a solução de DNA ficasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20° C.

4.5 PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real é uma técnica confiável para a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR) e é baseada na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

Por ser capaz de medir os produtos de PCR conforme estes vão se acumulando, ou “em tempo real”, é possível saber a quantidade de produto em um ponto no qual a reação ainda está na fase exponencial (GINZINGER, 2002). Por este motivo, essa técnica permite a quantificação, o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, pois não mais requer a detecção em gel de eletroforese. Outras vantagens ainda com relação à PCR qualitativa são a maior sensibilidade, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (NOVAIS, PIRES-ALVES & SILVA, 2004).

Neste trabalho foi utilizado o composto fluorescente *SYBR Green*, um fluoróforo em suspensão, intercalante de DNA dupla fita, que emite uma fluorescência verde com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador. Quando não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena, a qual é realçada quando o fluoróforo se liga à fita dupla de DNA.

Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do *SYBR Green* vão se ligando ao DNA recém sintetizado, e um aumento da fluorescência é observado em tempo real, o que possibilita o monitoramento contínuo da reação. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do fluoróforo são liberadas e há queda no sinal de fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado. As vantagens da utilização do *SYBR Green* são o baixo custo quando comparado a outros fluoróforos, a facilidade no uso e a sensibilidade. Por ser um sistema de detecção não específico, muitas vezes ele pode se ligar aos dímeros de oligonucleotídeos iniciadores ou a outros produtos inespecíficos, resultando em um controle negativo positivo. No entanto, permite a utilização da curva de dissociação ou *melting*, a qual permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de T_m (*melting temperature*) entre eles causadas pelo número e composição de bases de cada um. Essa curva resulta de um aumento gradual da temperatura de 60° para 95°; à medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com esse aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do *SYBR Green*.

Durante a reação de PCR, o sinal fluorescente (R_n) aumenta na mesma proporção da quantidade de produto amplificado. A figura a seguir mostra uma curva

de amplificação de um produto de PCR em tempo real, a qual contém três fases distintas que caracterizam a progressão da PCR.

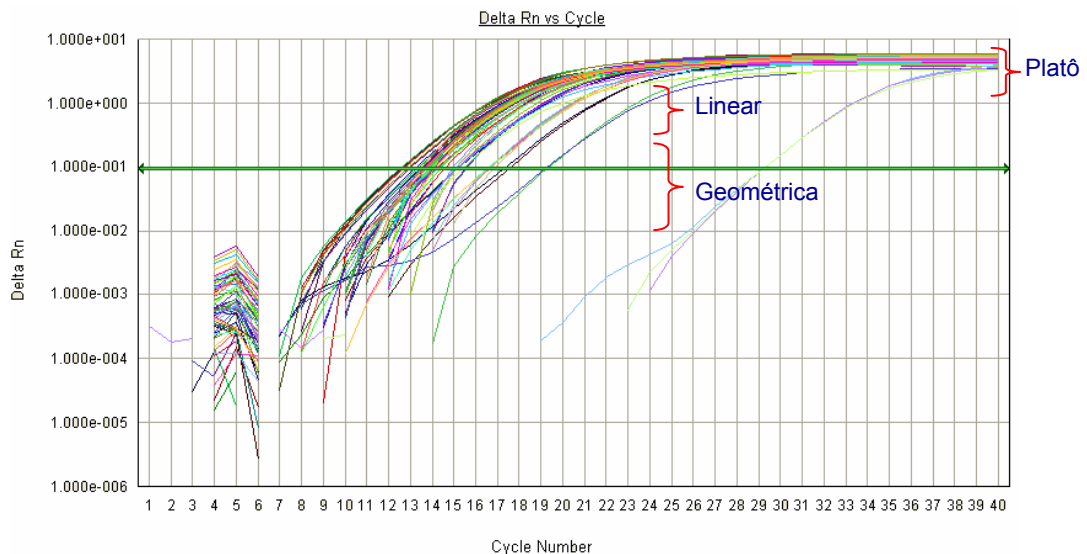


Figura 3. Gráfico ΔRn (variação no sinal fluorescente) x número de ciclos mostrando uma curva de amplificação obtida em uma reação de PCR em tempo real com suas 3 fases características.

Nas três fases o sinal é detectado e aumenta de maneira diretamente proporcional ao aumento do produto de PCR. Na fase geométrica o aumento do produto é proporcional à quantidade inicial e, idealmente, dobra sua quantidade a cada ciclo. A amplificação é caracterizada por uma eficiência alta e constante. Na fase linear, um ou mais componentes da PCR diminui abaixo da concentração crítica e a inclinação da curva começa a diminuir, diminuindo também a eficiência. Por último, a PCR alcança uma fase estacionária, na qual não é produzido amplicon e o sinal fluorescente permanece relativamente constante; é o platô (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; SCHEFE *et al.*, 2006)

4.5.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Foram utilizados três pares de iniciadores: um para o gene *18S*, o qual atuou como controle endógeno por ter seus níveis de amplificação e expressão inalterados em tecidos tumorais (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000; BLANQUICETT *et al.*, 2002), um para o gene *BCHE* e outro para o gene *ACHE*, sendo que em ambos os genes das colinesterases o fragmento amplificado situa-se no éxon 2. As seqüências dos iniciadores utilizados são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e comprimentos dos fragmentos amplificados.

Gene	Iniciador Avante	Iniciador Reverso	Fragmento Amplificado
<i>18S</i>	5' GTAACCCGTTGAACCCATT 3'	5' CCAT CCAATCGGTAGTAGCG 3'	153 pb
<i>BCHE</i>	5' CGGGTTGAAAGAGTTATTGTAG 3'	5' GAACCCACTGAAGAGCCAAC 3'	133 pb
<i>ACHE</i>	5'TGTCCTCGTCTGGATCTATG 3'	5' AGGGCCAGGAAGCCAAAG 3'	144 pb

4.5.2 Concentração das Amostras

A concentração do DNA foi determinada com a utilização do fluorímetro *Qubit™ Quantification System* (Invitrogen), o kit de quantificação *Quant-it™ dsDNA BR Assays* (0,2-1000 ng) e os tubos de prolipropileno (*Qubit assay tubes*). Para a realização da leitura seguiu-se o protocolo do fabricante, utilizando-se apenas 1 µl de cada amostra. Estas, posteriormente, foram ajustadas para uma concentração de 8 ng/µl.

4.5.3 Amplificação do DNA

Para a realização da PCR foi utilizado o equipamento *7300 Real-Time PCR System* e placas contendo 96 poços (*MicroAmp®Optical 96-WellReaction Plate*), ambos da Applied Biosystems. Cada placa foi montada para um gene em particular e todas continham: uma curva de diluição com 4 pontos em triplicata (Figura 10 na página 48), amostras de DNA de sangue e de tumor de 13 pacientes, e um controle negativo, todos em triplicata. Posteriormente, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada dado.

Todas as reações foram realizadas com um volume final de 20 µl/poço: 10 µl de *Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 5 µl de amostra (ou água ultra-pura, no caso dos controles negativos), 0,5µl de cada oligonucleotídeo iniciador para o gene *18S* e 1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador para os genes *BCHE* e *ACHE* - na concentração de 0,2 µM cada um - e o restante de água ultra-pura.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C, por 1 minuto. A fluorescência foi medida ao final de cada fase de extensão. Por fim, foi realizada a

curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou outros produtos inespecíficos.

4.5.4 Construção da Curva Padrão

A amplificação dos segmentos realizada pela PCR em tempo real foi analisada por meio da quantificação relativa, a qual determina o número de cópias de um gene alvo em relação a um controle interno (*housekeeping gene*). Os cálculos baseiam-se, indiretamente, na comparação dos C_T s (*Cycle threshold*), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção (*threshold*), conforme mostra a Figura 4. Quanto maior for a quantidade inicial de DNA genômico, mais cedo o produto acumulado é detectado na PCR e menor será o valor do C_T .

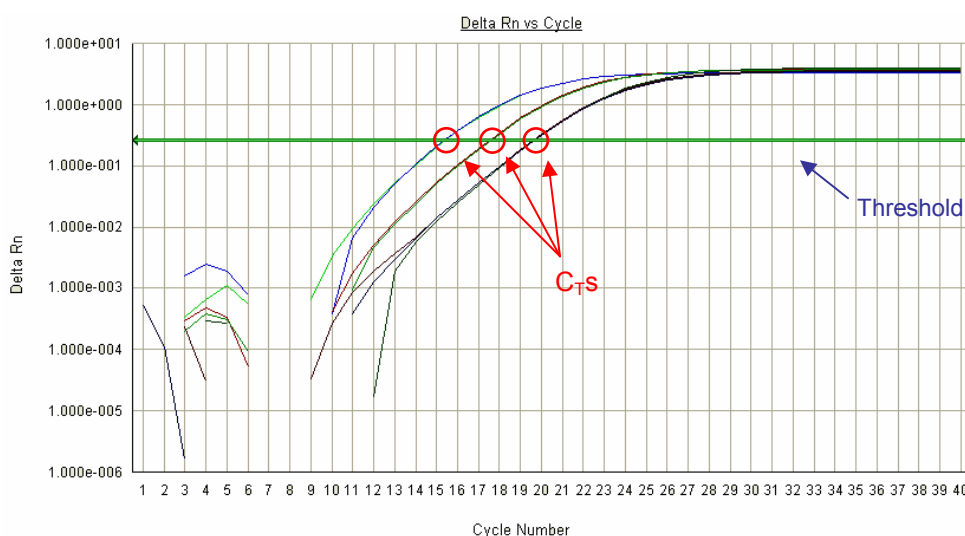


Figura 4: Exemplos de curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real. C_T s (*cycle threshold*) = nº de ciclos necessários para atingir determinado nível de fluorescência (*threshold*).

Para a quantificação utilizou-se o método da Curva Padrão, que se baseia na comparação de dados obtidos em uma diluição padrão com os das amostras desconhecidas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; LARIONOV, KRAUSE & MILLER, 2005; DORAK, 2006). Para a utilização deste método, faz-se uma diluição seriada de uma amostra com concentração conhecida; relacionando-se os C_T s das amostras dessa diluição seriada com os C_T s das amostras que estão sendo investigadas é possível inferir a quantidade de DNA que estas últimas contêm: se uma amostra

tiver um C_T equivalente ao de algum ponto da curva de diluição significa que ela contém a mesma quantidade do gene alvo que este determinado ponto representa. Fez-se, então, uma diluição seriada de razão 4 obtendo-se, em cada uma das placas, uma curva de diluição com os seguintes pontos em triplicata: 100 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 6,25 ng/ μ l e 1,56 ng/ μ l. Os C_T s e as concentrações das amostras em teste foram determinados pelo *Software 7300 System SDS*, que acompanha o equipamento da Applied Biosystems.

Para cada curva padrão, o *software* procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R^2 , o *slope* (inclinação da curva) e o *y-intercept* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006) (Figura 5). O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência de amplificação para o ensaio (um valor de -3,32 representa uma eficiência de 100%), e o *y-intercept* indica o valor esperado de C_T para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se o *slope* pôde-se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$.

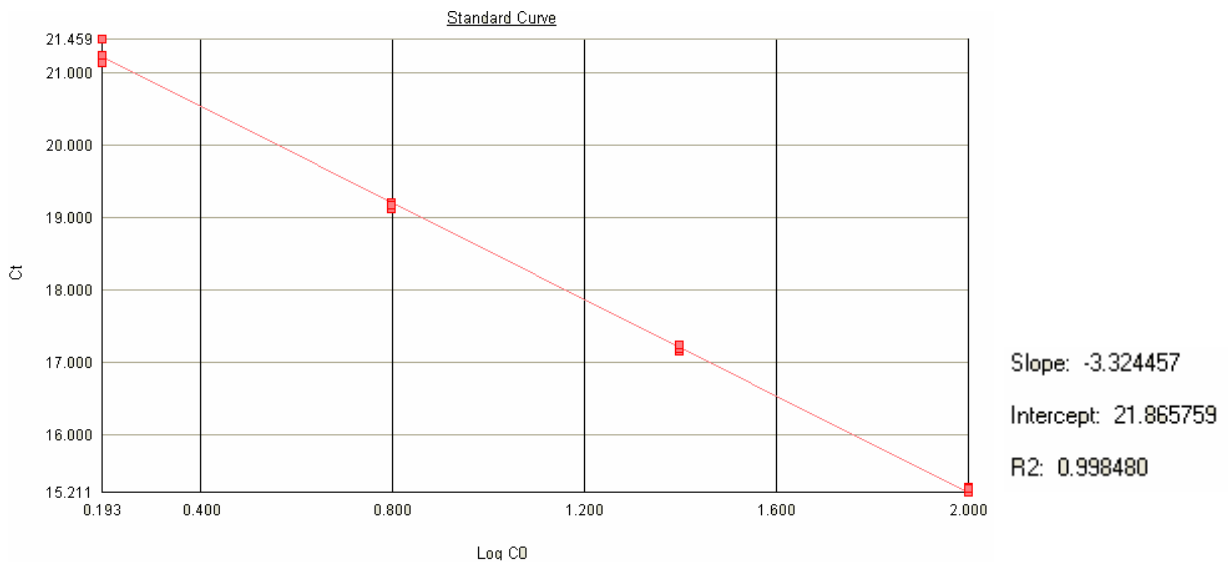


Figura 5. Gráfico de regressão linear fornecido pelo software; ao lado pode ser observado o coeficiente de determinação (R^2) e o grau de inclinação da reta (*slope*), valores que determinam a eficiência da reação.

4.5.5 Critérios de Análise das Curvas de Amplificação

Para a maioria das placas, o *threshold* foi ajustado manualmente, procurando-se uma posição satisfatória para todas as amostras, sempre na fase geométrica de

cada uma. Para algumas placas, manteve-se o *threshold* automático, determinado pelo próprio *software*.

Para a análise estatística foram utilizadas as amostras que apresentaram uma boa reprodutibilidade, com os C_T s da triplicata muito próximos entre si (desvio $\leq 0,50$), e com curvas paralelas à curva padrão (Figura 6). Algumas, no entanto, foram incluídas na estatística com ressalvas, por apresentarem um desvio entre os C_T s um pouco maior (até 0,52) (Figura 7a) ou por não estarem 100% paralelas com as da curva padrão (Figura 7b). Por esses motivos foram incluídas no grupo “amostras com comportamento diferente”, e as análises foram feitas com e sem esse grupo. Amostras fora dessas condições (desvio entre os C_T s maiores que 0,5), ou apresentando uma curva com uma inclinação muito diferente das da curva padrão (Figura 8), ou ainda um C_T muito próximo dos obtidos para o controle negativo, foram descartadas.

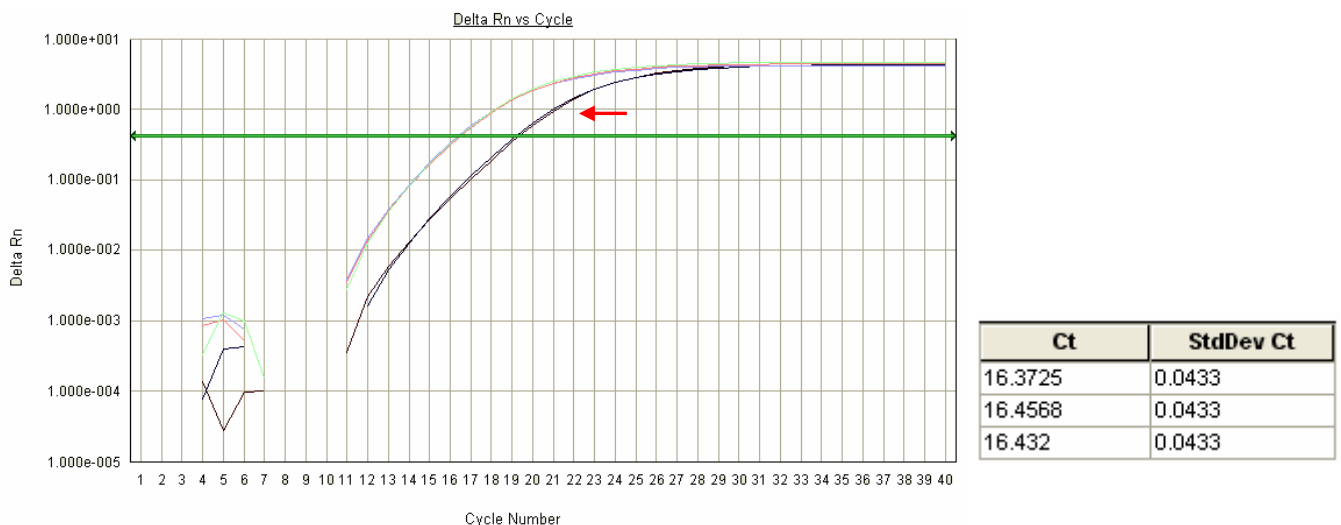


Figura 6. Exemplo de curvas de amplificação de triplicatas consideradas para a análise estatística. Observa-se as curvas de uma triplicata sobrepostas (mostrando que tiveram praticamente o mesmo C_T) e paralelas à uma curva padrão (seta).

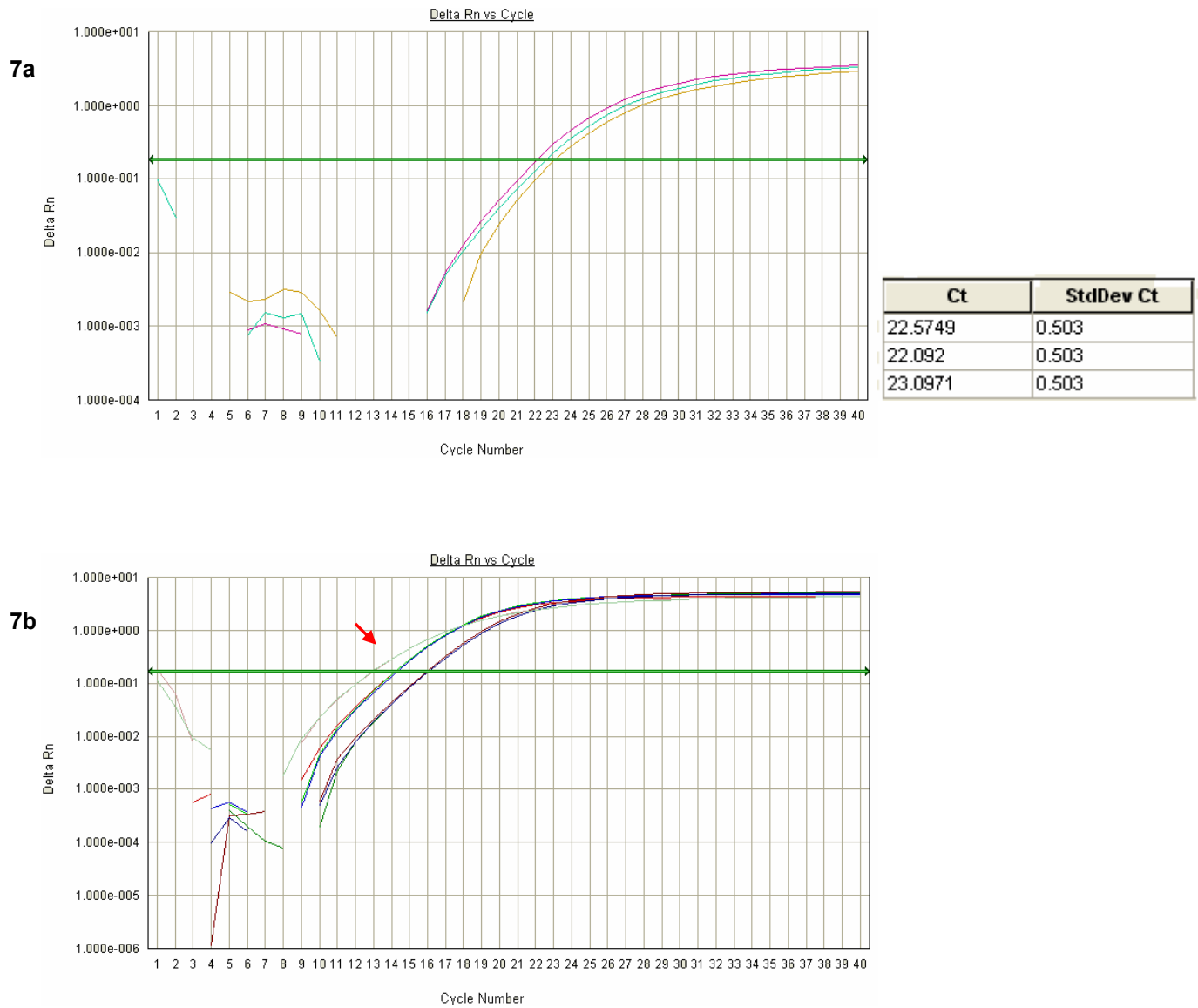


Figura 7. Curvas da triplicata de amostras consideradas, porém com ressalva; **7a)** Desvio entre os $C_{Ts} > 0,5$. **7b)** Curvas da amostra (seta) não tão paralelas com as da curva padrão.

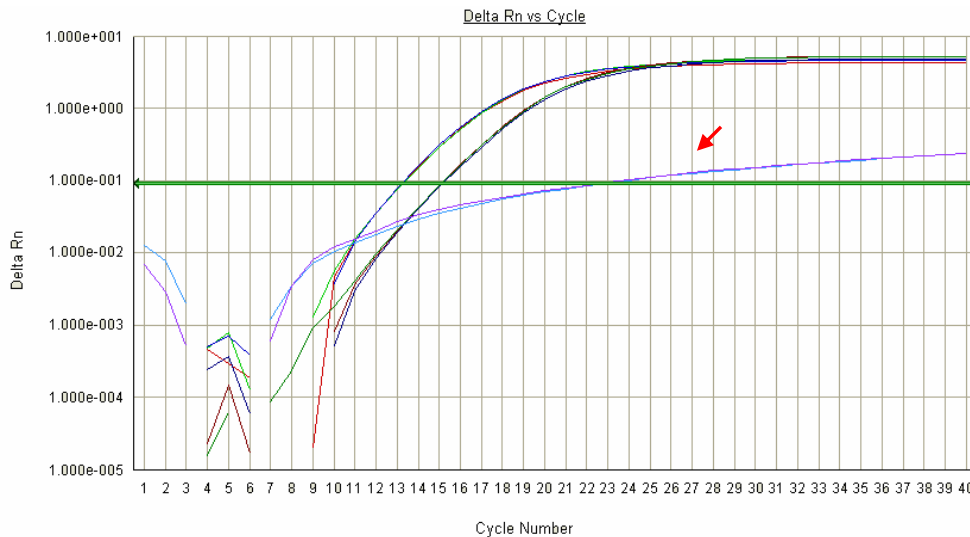


Figura 8. Curva de amplificação de uma amostra considerada de má qualidade (seta) e, portanto, descartada desse estudo. Compare a inclinação desta curva com duas outras da curva padrão: aquela não apresenta nenhuma das três fases bem definidas.

4.5.6 Interpretação e Análise dos Dados

Para cada amostra, determinou-se a quantidade dos genes alvo (*BCHE* ou *ACHE*) e do controle endógeno (*18S*) tanto em tecido tumoral quanto no tecido sanguíneo, por meio do *Software 7300 System SDS*. Em seguida, calculou-se a relação (*Q*) entre as médias das quantidades dos genes alvo nesses dois tecidos, utilizando-se a fórmula (KÖNIGSHOFF *et al.*, 2003):

$$Q = \frac{\text{Tumor}_{\text{CHE}} / \text{Tumor}_{18\text{S}}}{\text{Sangue}_{\text{CHE}} / \text{Sangue}_{18\text{S}}}$$

Utilizando-se os coeficientes de variação (*CV*) obtidos das triplicatas dos tumores de cada gene alvo e dos tumores do controle endógeno, foi obtido o desvio padrão (*S*) de *Q*, da seguinte maneira (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004):

$$CV_1 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor}_{\text{CHE}}}{\text{Média Tumor}_{\text{CHE}}} \quad \text{e} \quad CV_2 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor}_{18\text{S}}}{\text{Média Tumor}_{18\text{S}}}$$

$$CV = (CV_1^2 + CV_2^2)^{1/2}$$

E, finalmente:

$$S = CV \cdot Q$$

Dessa forma determinou-se em valores relativos a comparação entre a quantidade dos genes no sangue e no tumor de uma mesma paciente. Se a quantidade dos genes alvo estiver aumentada no tecido tumoral o valor obtido com

esta fórmula será > 1 ; se não tiver sofrido alteração será $= 1$, e se estiver deletado será < 1 . Desse valor, inferimos se o gene está ou não amplificado (presente em um maior número de cópias) ou deletado no tecido tumoral. Foi utilizado um intervalo de confiança (IC) de 95%. Considerou-se amplificação quando o limite inferior do IC foi >1 e o limite superior $\geq 1,5$, e deleção quando os limites inferior e superior foram $\leq 0,5$ e < 1 , respectivamente.

Foi verificada a possível correlação entre os dados obtidos para cada gene, e também destes com as características clinico-histopatológicas das pacientes. Para tanto, foi utilizado o programa Statistica for Windows (StatSoft, Inc, 2000), no qual as informações resultantes das reações de PCR foram organizadas de três formas distintas: 1) valores da quantificação relativa (Q); 2) casos de amplificação e deleção (às deleções atribuiu-se o valor "0", às que não sofreram alteração o valor "1", e às amplificações o valor "2"); 3) alterações de maneira geral, no qual tanto às deleções quanto às amplificações foram atribuídos o valor "1", e "0" àquelas que não sofreram alteração. Os gráficos de correlação representam distintos tamanhos amostrais, uma vez que há diferença no número de variáveis registradas para cada paciente.

5. RESULTADOS

5.1 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real foi realizada em 202 amostras (101 tecidos tumorais e 101 tecidos sanguíneos), totalizando 101 pacientes. Dessas 202, 19 não amplificaram e 26 apresentaram uma cinética de amplificação diferente, sem a menor reprodutibilidade, e foram excluídas do estudo; por se tratar de um estudo com amostras pareadas, descartou-se também o respectivo par das mesmas. Uma paciente ainda teve que ser excluída por seu tumor tratar-se de uma neoplasia benigna (fibroadenoma), o que só foi descoberto após as reações de PCR já terem sido realizadas. Algumas amostras ainda apresentaram uma curva de amplificação com um comportamento um pouco diferente do normal para se estabelecer uma quantificação exata com segurança, mas ainda assim foram levadas em consideração. Para se ter certeza de que elas não estariam levando a uma interpretação errada dos dados, as análises foram feitas também sem esse grupo de amostras. Ao final, portanto, este estudo foi realizado com dois grupos amostrais: um com 55 pacientes e outro com 42 pacientes.

Em cada reação, obtiveram-se gráficos de amplificação similares ao da Figura 9; nela pode ser observado o posicionamento do limiar (*threshold* - linha horizontal verde) logo no início da fase geométrica de progressão da PCR. As informações dadas pelo *software* – baseadas nos C_T s – tais como as quantidades médias das triplicatas e desvios-padrão das mesmas, para os genes *18S*, *BCHE* e *ACHE*, das amostras de sangue e de tumor de cada paciente, foram utilizadas para calcular as quantidades relativas (Q) de cada gene.

Todas as reações resultaram em uma curva padrão semelhante a da Figura 10. Observa-se que, por ser uma diluição seriada de razão quatro, há uma diferença de dois C_T s entre cada ponto da curva padrão, já que a cada ciclo o produto amplificado dobra. Baseado na relação dos C_T s com a quantidade pré-determinada de DNA em cada ponto da curva padrão, o *software* calculou o *slope*, o qual foi utilizado para o cálculo da eficiência de cada reação, o *y-intercept*, e o R^2 . Na Tabela 3 estão listados os *slopes*, os R^2 e as eficiências obtidos em cada uma das placas realizadas.

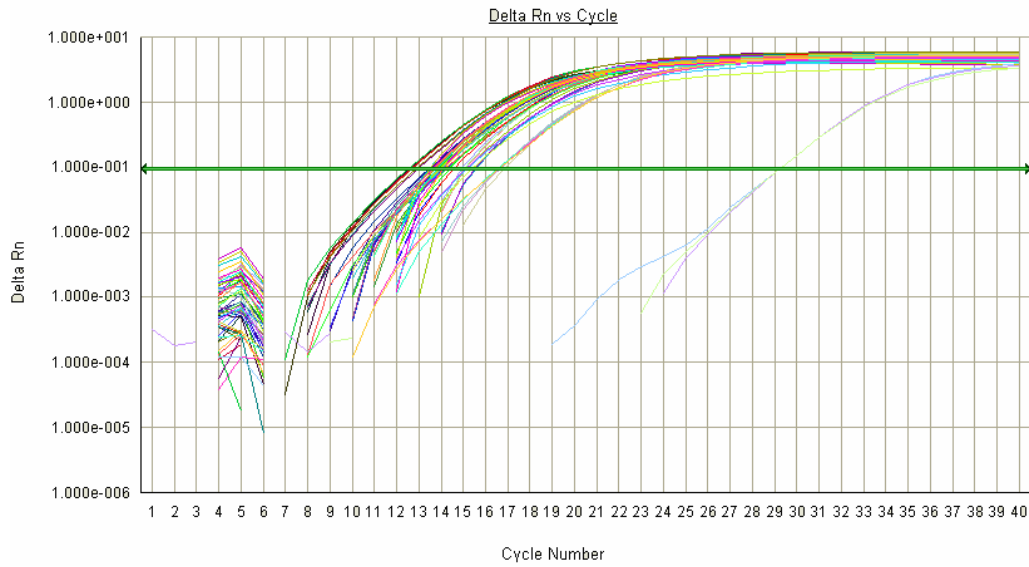


Figura 9: Gráfico de amplificação obtido em uma das reações de PCR em tempo real realizadas para o gene 18S; cada linha corresponde a uma amostra.

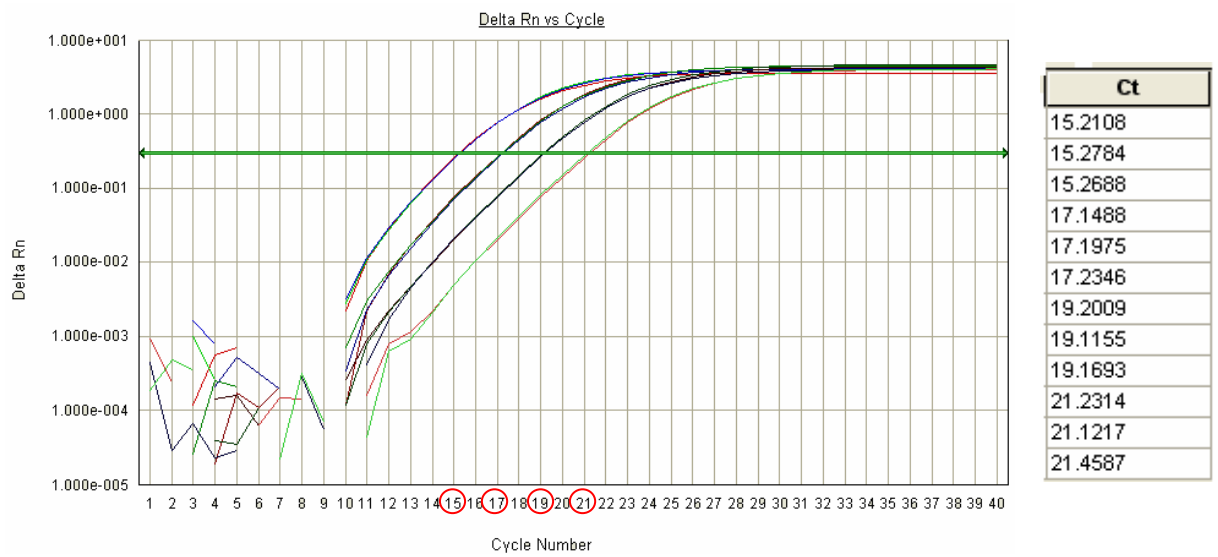


Figura 10. Curva padrão obtida em uma das reações de PCR em tempo real, com os C_t s das triplicatas ao lado.

Tabela 3. Valores de inclinação da curva (*Slope*), coeficiente de determinação (R^2) e eficiência de cada reação realizada.

GENE	SLOPE	R^2	EFICIÊNCIA (%)
18S	-3,17	0,9975	106,76
	-3,25	0,9945	103,09
	-3,53	0,9982	91,99
	-3,37	0,9949	98,03
	-3,32	0,9985	100,08
	-3,19	0,9945	105,82
	-3,34	0,9985	99,25
	-3,23	0,9992	103,98
BCHE	-3,31	0,9806	100,50
	-3,48	0,9903	93,80
	-3,32	0,9911	100,08
	-3,32	0,9926	100,08
	-3,37	0,9865	98,03
	-3,06	0,9865	112,23
	-3,42	0,9933	96,06
ACHE	-3,17	0,9949	106,76
	-3,47	0,9844	94,17
	-3,33	0,9939	99,66
	-3,41	0,9910	96,45
	-3,24	0,9940	103,54
	-3,18	0,9945	106,28

5.2 Controles Negativos e Temperaturas de Melting

Apesar dos esforços para se eliminar qualquer amplificação do controle negativo (CN), todas as reações apresentaram um CN com algum nível de amplificação. Contudo, a grande maioria dos CNs apresentou C_T maior do que 30 (Gráfico 1) e uma diferença entre a média de C_T s dos CNs e a média de C_T da amostra de maior C_T foi de pelo menos 5 (Gráfico 2), valores considerados aceitáveis (BUSTIN *et al.*, 2004). Ocorreram apenas duas exceções, as quais estão marcadas com um asterisco (*) nos Gráficos 1 e 2.

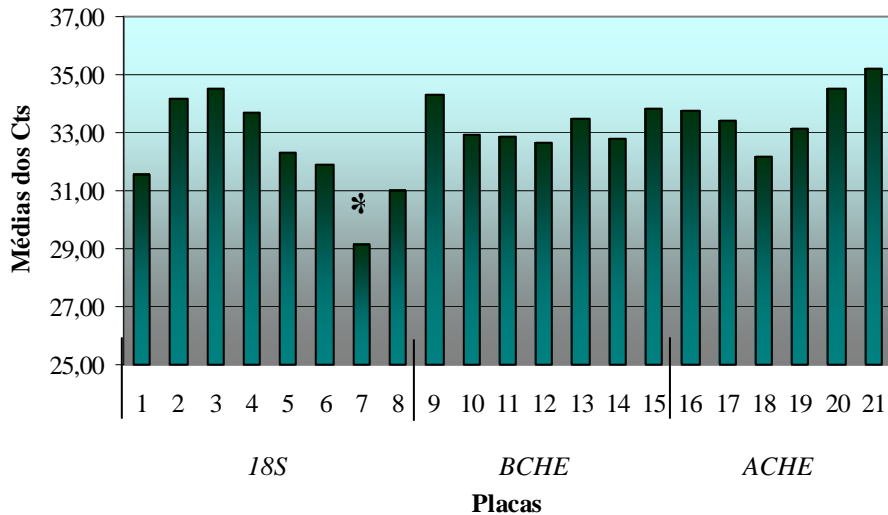


Gráfico 1. Médias dos C_Ts dos controles negativos obtidas nas reações realizadas.
* = valor menor do que os considerados aceitáveis em BUSTIN *et al.* (2004).

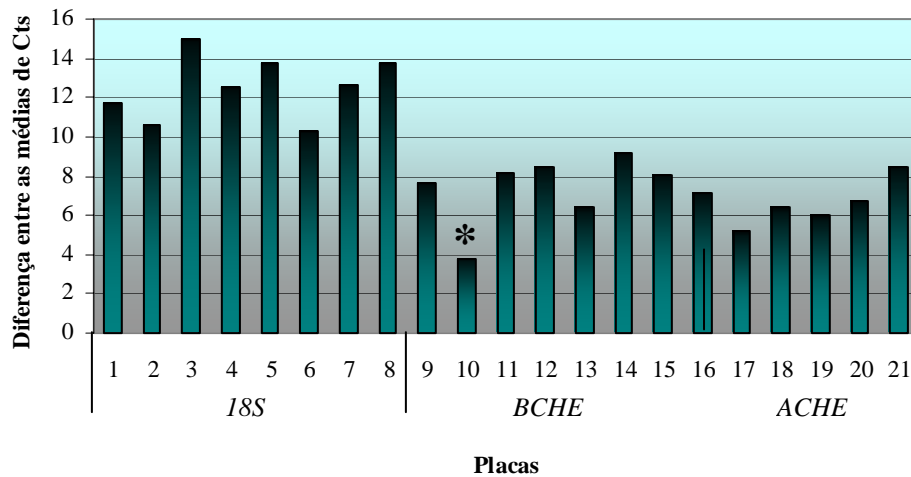


Gráfico 2. Diferença entre as médias dos C_Ts dos controles negativos e as médias dos C_Ts das amostras de maior C_T.
* = valor menor do que os considerados aceitáveis em BUSTIN *et al.* (2004).

Em algumas reações, os CNs ainda apresentaram um pico de dissociação menor do que o pico das amostras, como pode ser observado na Figura 11.

As médias das temperaturas de *melting* do amplicon obtidas nas diferentes reações para cada gene foram: $81,16 \pm 0,09$ para o fragmento do gene *18S*; $78,73 \pm 0,08$ para o fragmento do gene *BCHE* e $84,60 \pm 0,12$ para o do gene *ACHE* (Figura 11).

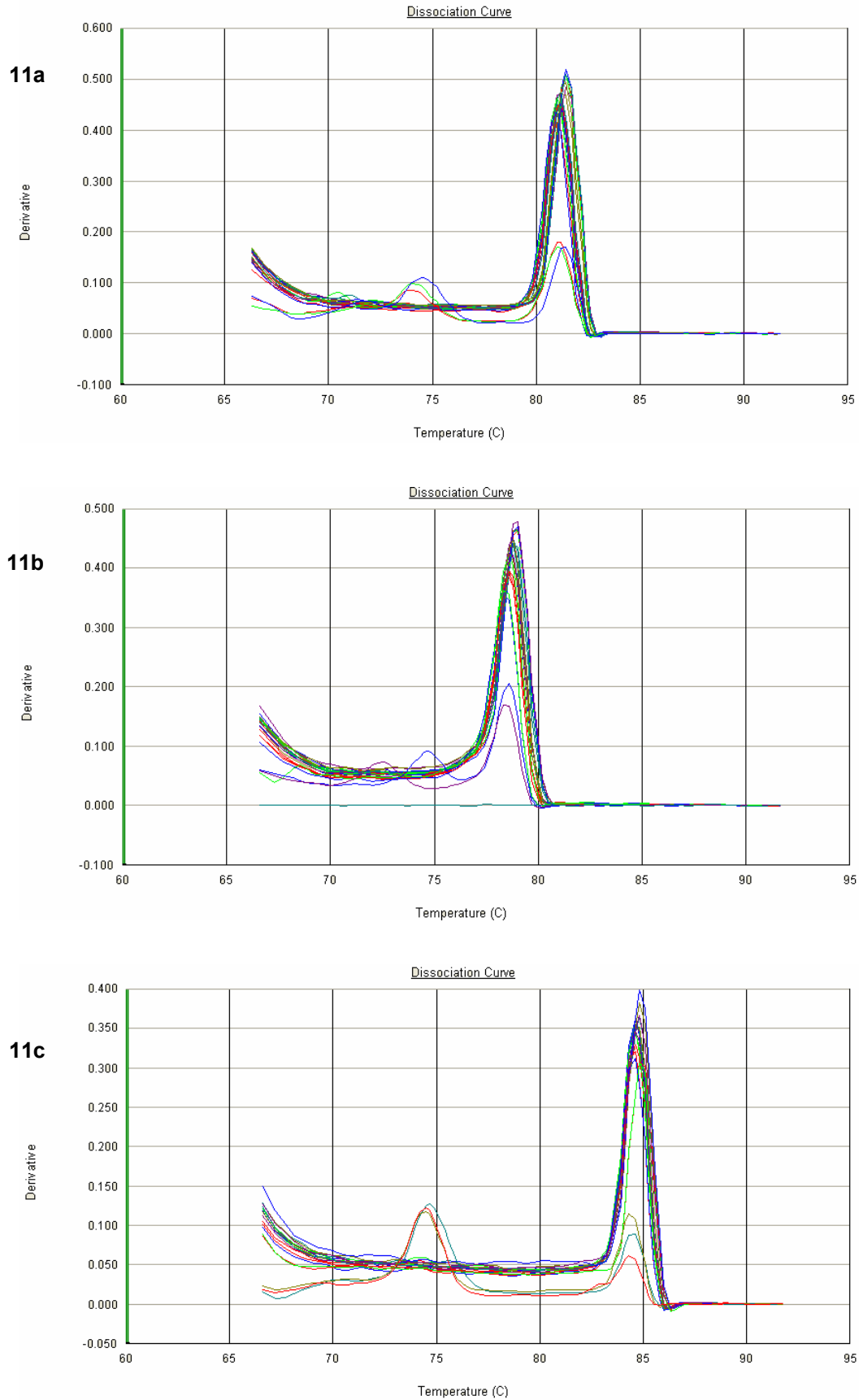


Figura 11. Curvas de dissociação obtidas para os 3 genes. **11a)** Curva de dissociação do gene *18S*; T_m de aproximadamente 81°C. **11b)** Curva de dissociação do gene *BCHE*; T_m de aproximadamente 78°C. **11c)** Curva de dissociação do gene *ACHE*; T_m de aproximadamente 84°C. Nos 3 gráficos podem ser observados picos menores e até mesmo com diferentes T_m s; correspondem aos controles negativos.

Os resultados obtidos por meio das reações de PCR em tempo real foram organizados na Tabela 4. Os dados desta tabela representam uma comparação entre a quantidade de cada gene alvo encontrada no tecido tumoral com relação ao tecido sangüíneo. Uma relação igual a 1 significa que o gene está presente na mesma quantidade em ambos os tecidos; já uma relação maior ou menor que 1 denota um aumento ou uma diminuição, respectivamente, sugerindo amplificações ou deleções desse gene no tecido canceroso. O valor de corte foi estipulado calculando-se um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 4. Quantidades relativas dos genes *BCHE* e *ACHE* e desvios padrão obtidos pelo método da Curva Padrão e por meio da relação $(\text{Tumor}_{\text{CHE}}/\text{Tumor}_{18\text{S}}) / (\text{Sangue}_{\text{CHE}}/\text{Sangue}_{18\text{S}})$ de 55 pacientes portadoras de câncer mamário esporádico.

(continua)

AMOSTRA	BCHE	ACHE
1	0,80 ± 0,10	0,95 ± 0,12
2	0,45 ± 0,12 ^d	0,52 ± 0,09 ^d
3		1,16 ± 0,09
4	1,46 ± 0,18 ^a	
5	0,31 ± 0,03 ^d	0,89 ± 0,13
6	4,09 ± 0,80* ^a	
7		2,17 ± 0,51 ^a
8	2,51 ± 0,25 ^a	1,74 ± 0,13 ^a
9	0,26 ± 0,09* ^d	0,49 ± 0,01* ^d
10	0,30 ± 0,06* ^d	
11	0,69 ± 0,15* ^d	0,71 ± 0,14 ^d
12		1,05 ± 0,07
13	0,28 ± 0,02 ^d	0,29 ± 0,09 ^d
14	0,89 ± 0,10	
15	2,79 ± 0,27 ^a	2,17 ± 0,28 ^a
16	1,79 ± 0,24 ^a	5,02 ± 0,70 ^a
17	1,70 ± 0,20 ^a	2,42 ± 0,20 ^a
18	7,07 ± 1,49* ^a	3,19 ± 0,52 ^a
19	5,20 ± 0,65 ^a	5,88 ± 0,31 ^a
20	3,49 ± 0,40* ^a	10,72 ± 3,87* ^a
21	1,99 ± 0,39 ^a	2,28 ± 0,29 ^a
22	3,07 ± 0,31 ^a	1,05 ± 0,15
23	0,18 ± 0,05 ^d	
24	0,46 ± 0,05 ^d	
25	0,57 ± 0,08 ^d	2,38 ± 0,27 ^a
26		0,16 ± 0,05* ^d
27	3,87 ± 0,59* ^a	3,25 ± 0,61* ^a
28	0,62 ± 0,08 ^d	0,86 ± 0,09
29		2,43 ± 0,30 ^a
30	14,32 ± 3,89* ^a	1,07 ± 0,18*

Tabela 4. Quantidades relativas dos genes *BCHE* e *ACHE* e desvios padrão obtidos pelo método da Curva Padrão e por meio da relação $(\text{Tumor}_{\text{CHE}}/\text{Tumor}_{18\text{S}}) / (\text{Sangue}_{\text{CHE}}/\text{Sangue}_{18\text{S}})$ de 55 pacientes portadoras de câncer mamário esporádico.

AMOSTRA	<i>BCHE</i>	<i>ACHE</i>
31		0,005 ± 0,0004 ^d
32	0,10 ± 0,03* ^d	0,23 ± 0,05* ^d
33	1,01 ± 0,22	
34	0,58 ± 0,06 ^d	0,87 ± 0,10
35	0,51 ± 0,04 ^d	0,59 ± 0,06 ^d
36	0,02 ± 0,005 ^d	0,10 ± 0,01 ^d
37	0,19 ± 0,03 ^d	0,31 ± 0,03 ^d
38	0,20 ± 0,03* ^d	0,22 ± 0,03* ^d
39	0,10 ± 0,01 ^d	0,92 ± 0,13
40	0,10 ± 0,01 ^d	
41	0,40 ± 0,05* ^d	0,44 ± 0,04* ^d
42		1,00 ± 0,12*
43	0,03 ± 0,004 ^d	1,96 ± 0,08 ^a
44	1,27 ± 0,30	0,38 ± 0,10* ^d
45	0,05 ± 0,01* ^d	0,07 ± 0,02* ^d
46	0,10 ± 0,01 ^d	0,12 ± 0,01 ^d
47	0,29 ± 0,02 ^d	0,46 ± 0,06 ^d
48	0,65 ± 0,09 ^d	0,56 ± 0,08 ^d
49	0,03 ± 0,007 ^d	0,04 ± 0,006 ^d
50	0,11 ± 0,04* ^d	0,14 ± 0,04* ^d
51	0,03 ± 0,004 ^d	0,28 ± 0,004 ^d
52	0,23 ± 0,05 ^d	0,25 ± 0,02 ^d
53	0,26 ± 0,04 ^d	0,63 ± 0,09 ^d
54	0,24 ± 0,06 ^d	0,20 ± 0,05 ^d
55	0,13 ± 0,01 ^d	0,24 ± 0,04 ^d

* Amostras consideradas, mas com ressalvas por apresentarem um comportamento diferente das demais.

^a Amostras cujo gene foi considerado amplificado na amostra tumoral.

^d Amostras cujo gene foi considerado deletado na amostra tumoral.

Os espaços em branco correspondem aos genes que apresentaram problemas na amplificação por PCR e, por esse motivo, foram considerados como "sem informação" para esse gene.

Os Gráficos 3, 4, 5 e 6 ilustram as porcentagens das alterações encontradas para os genes das colinesterases com base na quantificação relativa. Os Gráficos 3 e 4 referem-se respectivamente ao gene *BCHE* e ao gene *ACHE*, quando consideradas as 55 amostras. Já nos Gráficos 5 e 6, os quais fazem referência aos genes *BCHE* e *ACHE* respectivamente, foram excluídas as amostras com comportamento diferente. Nota-se um maior número de deleções de ambos os genes nos dois grupos de amostras.

Observa-se que para os dois genes, quando não se consideram as amostras do grupo de comportamento diferente, há uma diminuição no número de casos de

deleção, no entanto, essa diferença não foi significativa ($p > 0,90$ para o gene *BCHE*, $p > 0,50$ para o gene *ACHE*).

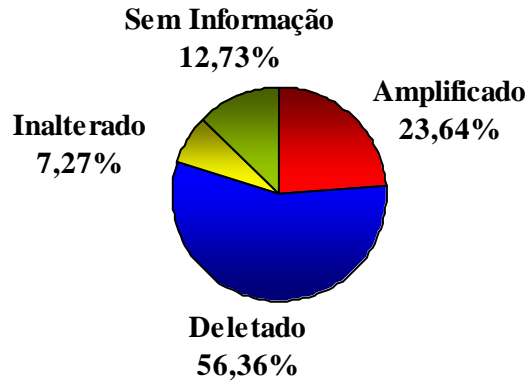


Gráfico 3. Alterações do gene *BCHE* encontradas em carcinomas mamários de 55 pacientes.

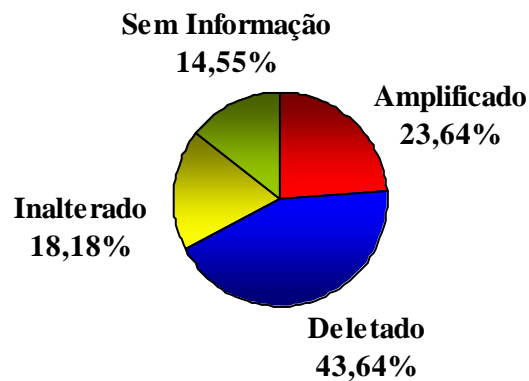


Gráfico 4. Alterações do gene *ACHE* encontradas em carcinomas mamários de 55 pacientes.

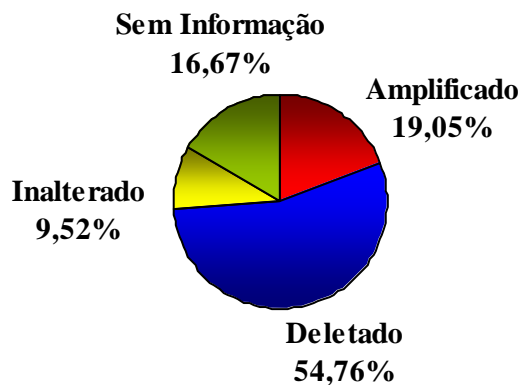


Gráfico 5. Alterações do gene *BCHE* encontradas em carcinomas mamários de 42 pacientes (excluíram-se as amostras com comportamento diferente).

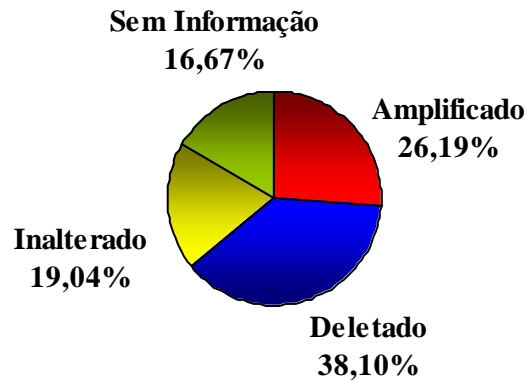


Gráfico 6. Alterações do gene *ACHE* encontradas em carcinomas mamários de 42 pacientes (excluíram-se as amostras com comportamento diferente).

Os Gráficos 7 e 8 mostram que foram encontradas correlações positivas entre os genes *BCHE* e *ACHE* quanto à variável amplificação e deleção, tanto para N=55 (77%, $p < 0,05$), quanto para N=42 (73%, $p < 0,05$).

Foi observada também uma correlação positiva de 38% ($p < 0,05$) entre os genes *BCHE* e *ACHE* quanto às quantificações relativas (Tumor/Sangue) quando analisadas todas as amostras, e uma correlação positiva de 77% ($p < 0,05$) quando não consideradas aquelas com comportamento diferente. Essas informações podem ser visualizadas nos Gráficos 9 e 10, respectivamente.

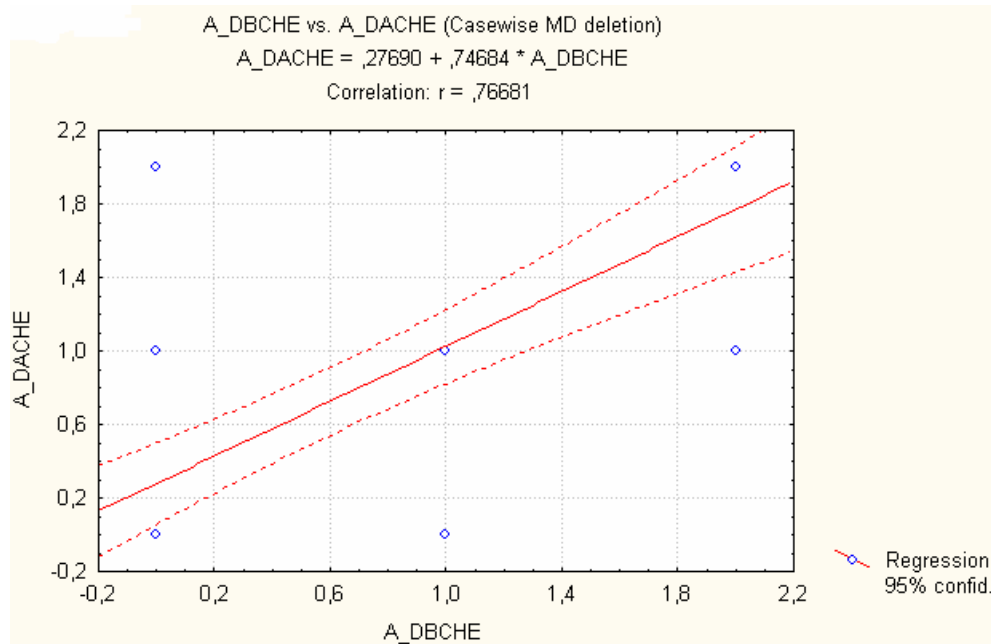


Gráfico 7. Correlação entre a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *ACHE* e a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. A_DACHE = Amplificações e deleções do gene *ACHE*; A_DBCHE = Amplificações e deleções do gene *BCHE*; 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=40).

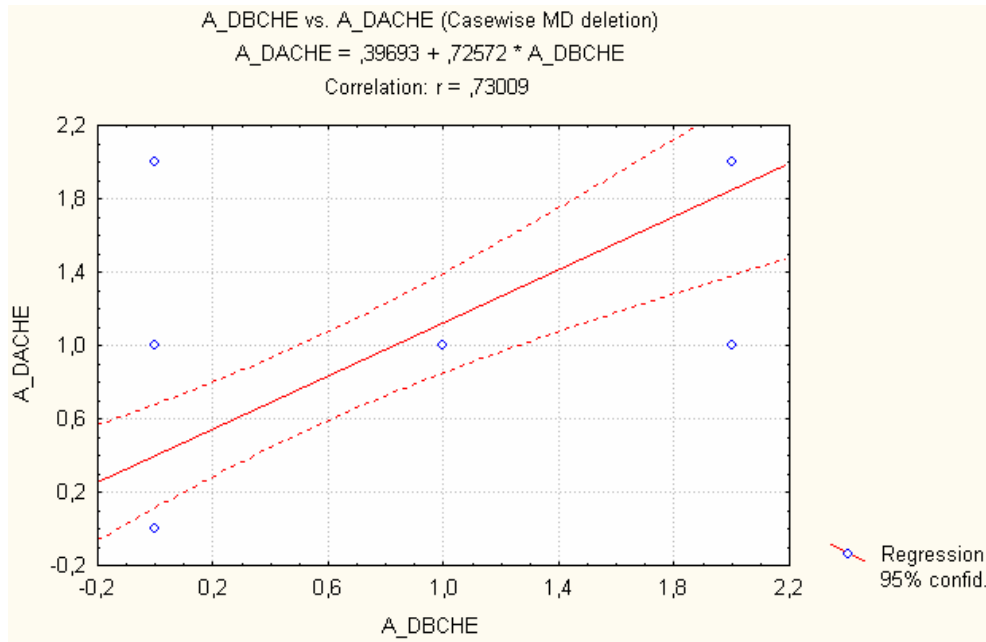


Gráfico 8. Correlação entre a variável ampliações e deleções encontrada para o gene *ACHE* e a variável ampliações e deleções encontrada para o gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. A_DACHE = Amplificações e deleções do gene *ACHE*; A_DBCHE = Amplificações e deleções do gene *BCHE*; 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=28).

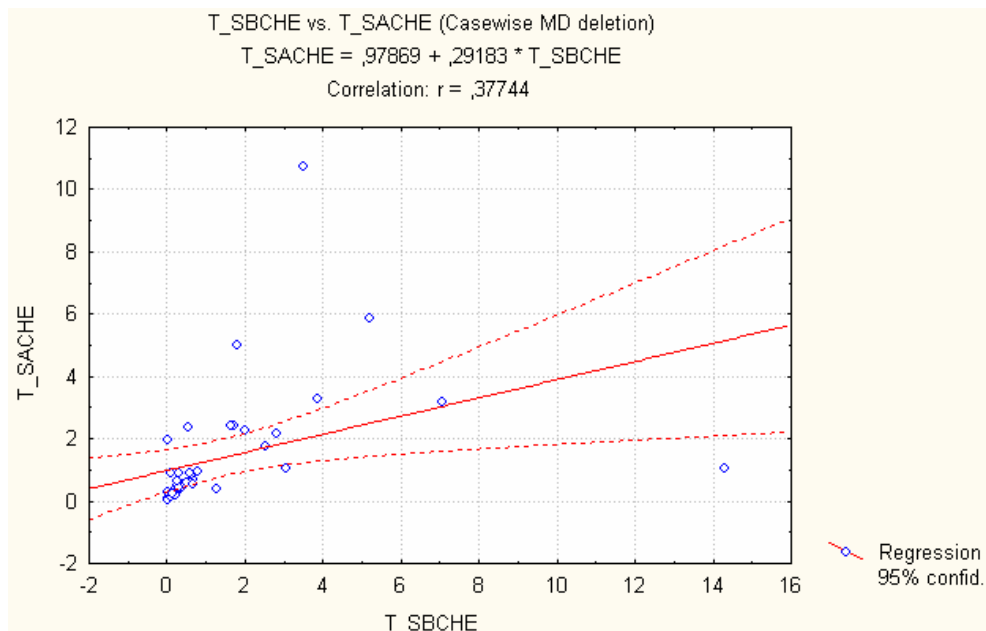


Gráfico 9. Correlação entre a variável quantidade relativa do gene *ACHE* e a variável quantidade relativa do gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. T_SACHE = Relação $(Tumor_{CHE}/Tumor_{18S}) / (Sangue_{CHE}/Sangue_{18S})$ para o gene *ACHE*; T_SBCHE = Relação $(Tumor_{CHE}/Tumor_{18S}) / (Sangue_{CHE}/Sangue_{18S})$ para o gene *BCHE*. (N=40).

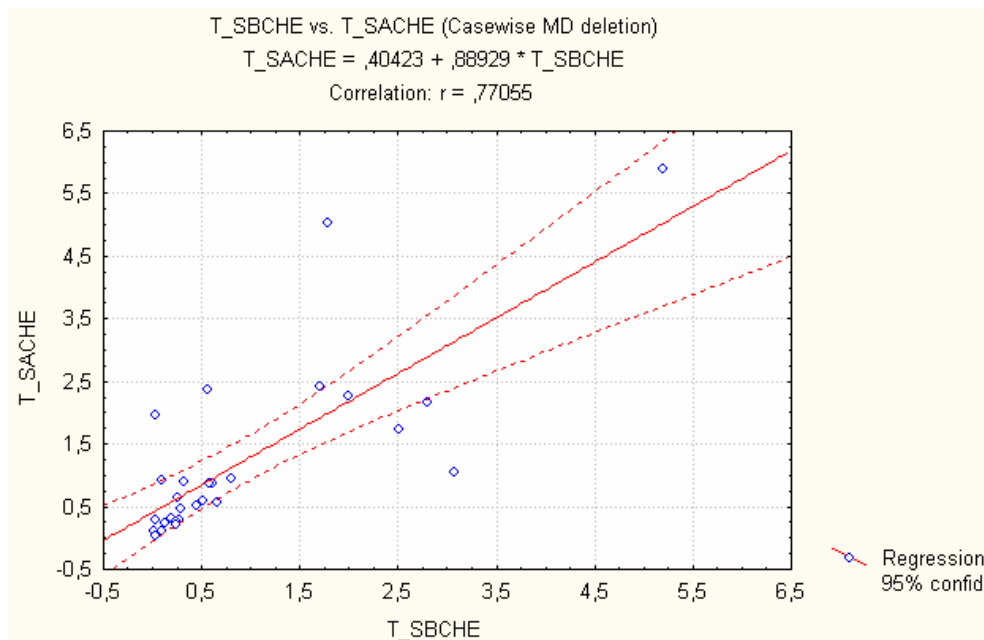


Gráfico 10. Correlação entre a variável Quantidade relativa do gene *ACHE* e a variável Quantidade relativa do gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. $T_SACHE = \text{Relação (Tumor}_{ACHE}/\text{Tumor}_{18S}) / (\text{Sangue}_{ACHE}/\text{Sangue}_{18S})$ para o gene *ACHE*; $T_SBCHE = \text{Relação (Tumor}_{CHE}/\text{Tumor}_{18S}) / (\text{Sangue}_{CHE}/\text{Sangue}_{18S})$ para o gene *BCHE*. (N=28).

5.4 Correlações das amplificações e deleções dos genes *ACHE* e *BCHE* com os dados clínico-histopatológicos

Verificou-se ainda se as informações obtidas para os genes das colinesterases estavam correlacionadas com as variáveis dos dados clínico-histopatológicos das pacientes. Foi encontrada uma correlação positiva de 48% ($p < 0,05$) entre os casos de amplificação e deleção do gene *ACHE* com o tamanho do tumor, apenas quando não se consideraram na análise as amostras com comportamento diferente (Gráfico 11).

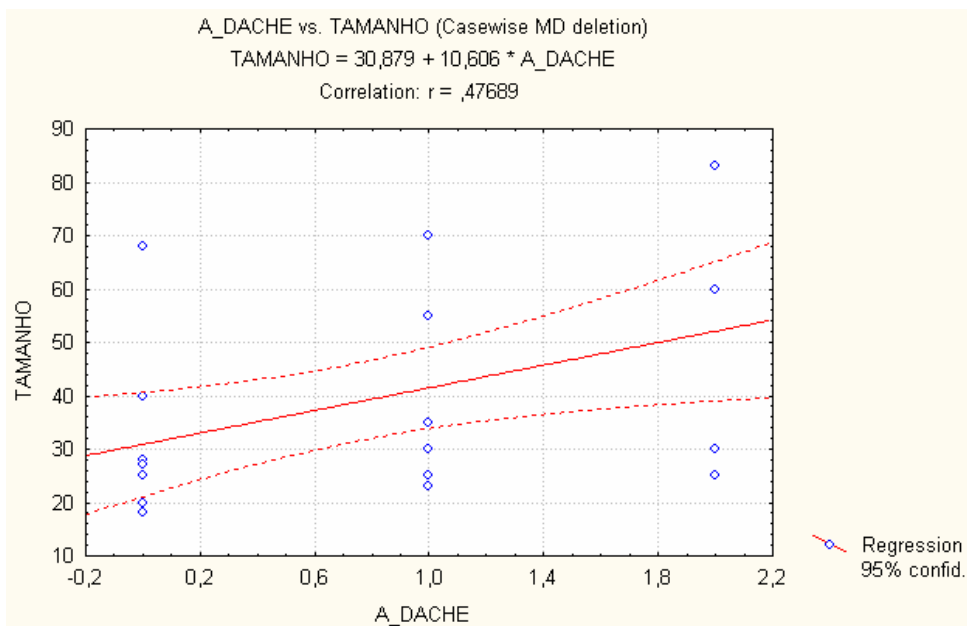


Gráfico 11. Correlação entre a variável tamanho do tumor e a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *ACHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. $TAMANHO = \text{Tamanho do tumor em mm}$; $A_DACHE = \text{Amplificações e deleções do gene } ACHE$; 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=24).

Observou-se também correlação negativa entre a variável amplificação e deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* com a variável amplificação do protooncogene *ERBB2*. Como os valores atribuídos foram: “0” às deleções, “1” às inalterações e “2” às amplificações, e, para o gene *ERBB2*, “1” para os casos em que este estava inalterado e “2” para os casos em que foi encontrado amplificado, uma correlação negativa mostra que o gene *ERBB2* encontra-se amplificado com maior frequência quando os genes das colinesterases estão deletados (Tabela 5). Quando considerada toda a amostra, as correlações foram de -49% ($p < 0,05$) para o gene *BCHE* e -52% ($p < 0,05$) para o gene *ACHE*. Já quando foram desconsideradas as com comportamento diferente, a correlação foi de -56% ($p < 0,05$) para o gene *ACHE* e de -38% ($p < 0,05$) para o gene *BCHE*, embora neste último caso ela não tenha sido significativa. Os Gráficos 12, 13, 14, 15 e 16 ilustram as informações significativas.

Tabela 5. Frequências (%) de deleções, inalterações e amplificações dos genes *BCHE* e *ACHE* encontradas quando o gene *ERBB2* estava ou não amplificado.

		<i>ERBB2</i>	
		Inalterado	Amplificado
<i>BCHE</i>	Deletado	31,8	27,3
	Inalterado	9,1	0,0
	Amplificado	31,8	0,0
<i>ACHE</i>	Deletado	20,0	25,0
	Inalterado	20,0	5,0
	Amplificado	30,0	0,0

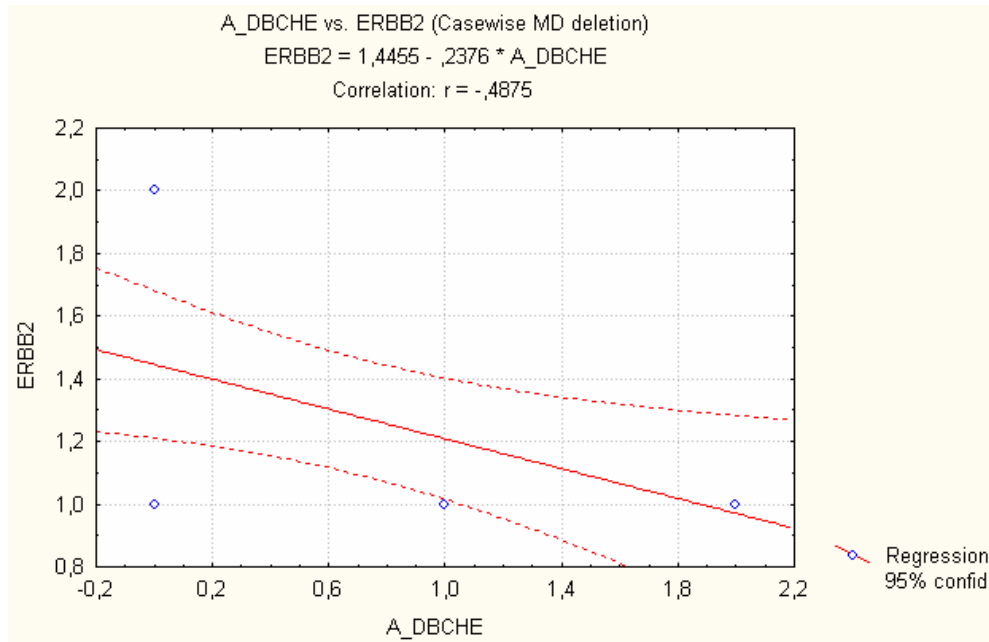


Gráfico 12. Correlação entre a variável amplificação do protooncogene *ERBB2* e a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. *ERBB2* = Gene *ERBB2*: 1 = Inalterado; 2 = Amplificado; *A_DBCHE* = Amplificações e deleções do gene *BCHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=22).

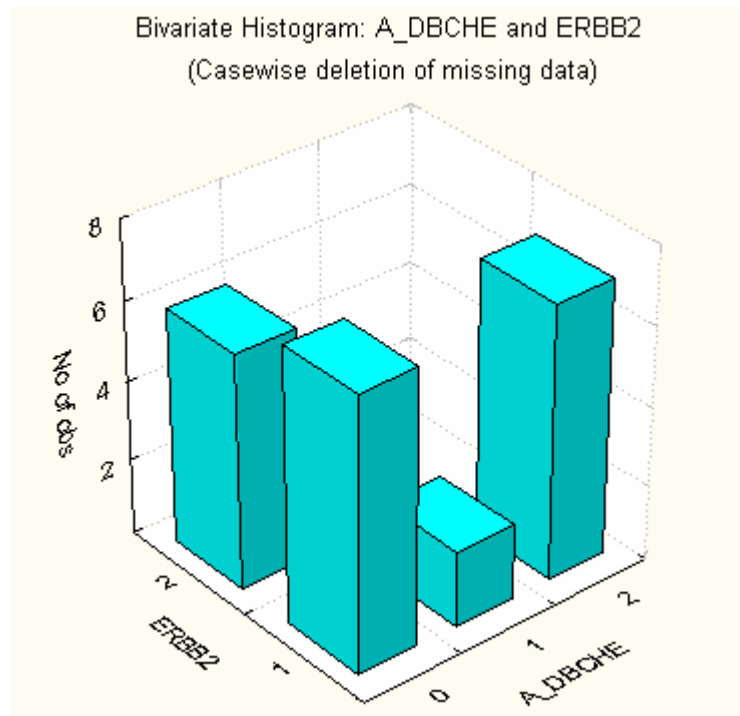


Gráfico 13. Amplificação do protooncogene *ERBB2* x amplificações e deleções encontradas para o gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. *ERBB2* = Gene *ERBB2*: 1 = Inalterado; 2 = Amplificado. *A_DBCHE* = Amplificações e deleções do gene *BCHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=22)

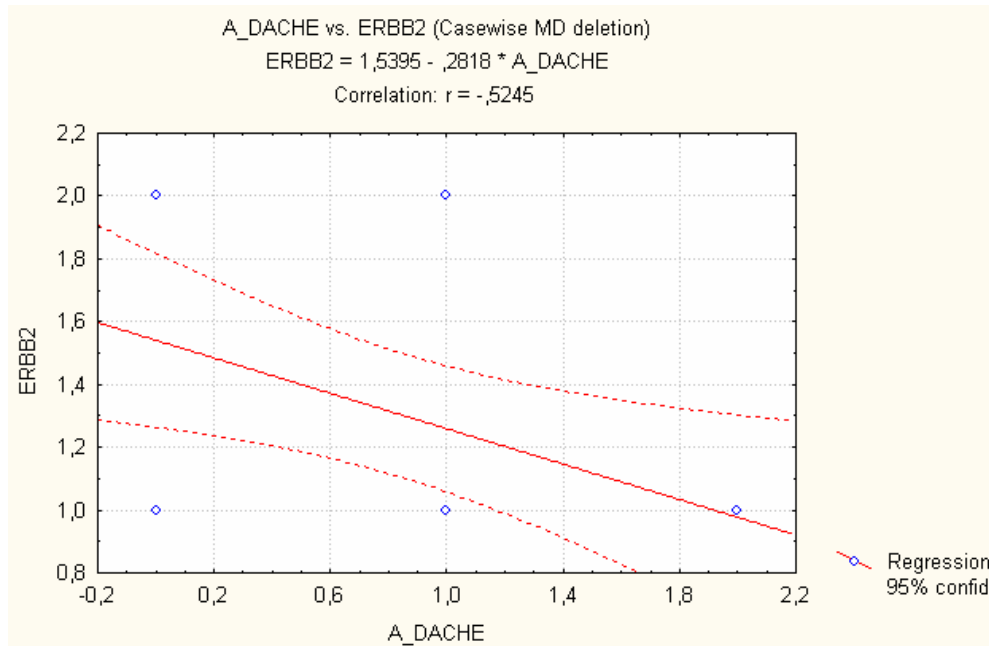


Gráfico 14. Correlação entre a variável amplificação do protooncogene *ERBB2* e a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *ACHE*, considerando-se todas as amostras. *ERBB2* = Gene *ERBB2*: 1 = Inalterado; 2 = Amplificado. *A_DACHE* = Amplificações e deleções do gene *ACHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=20).

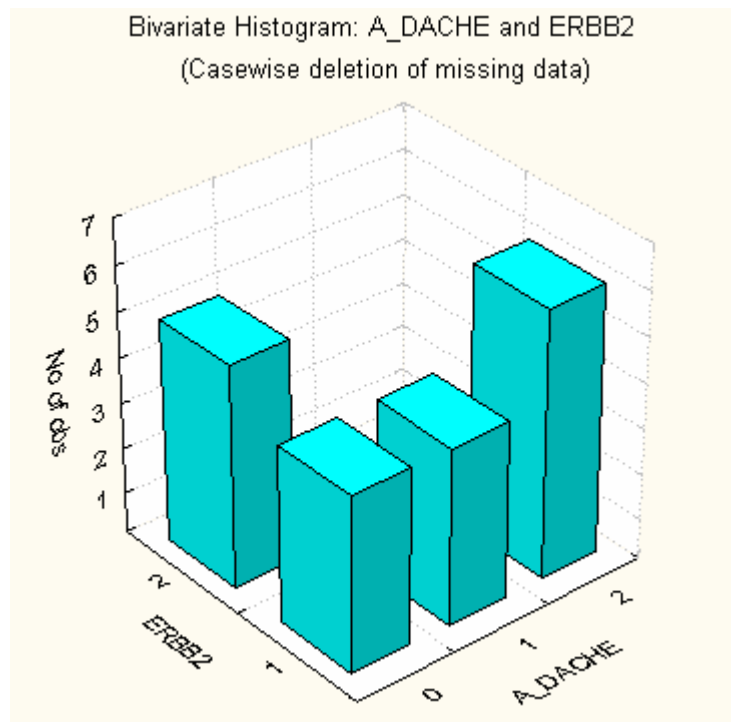


Gráfico 15. Amplificação do protooncogene *ERBB2* x amplificações e deleções encontradas para o gene *ACHE*, considerando-se todas as amostras. *ERBB2* = Gene *ERBB2*: 1 = Inalterado; 2 = Amplificado; *A_DACHE* = Amplificações e deleções do gene *ACHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=20).

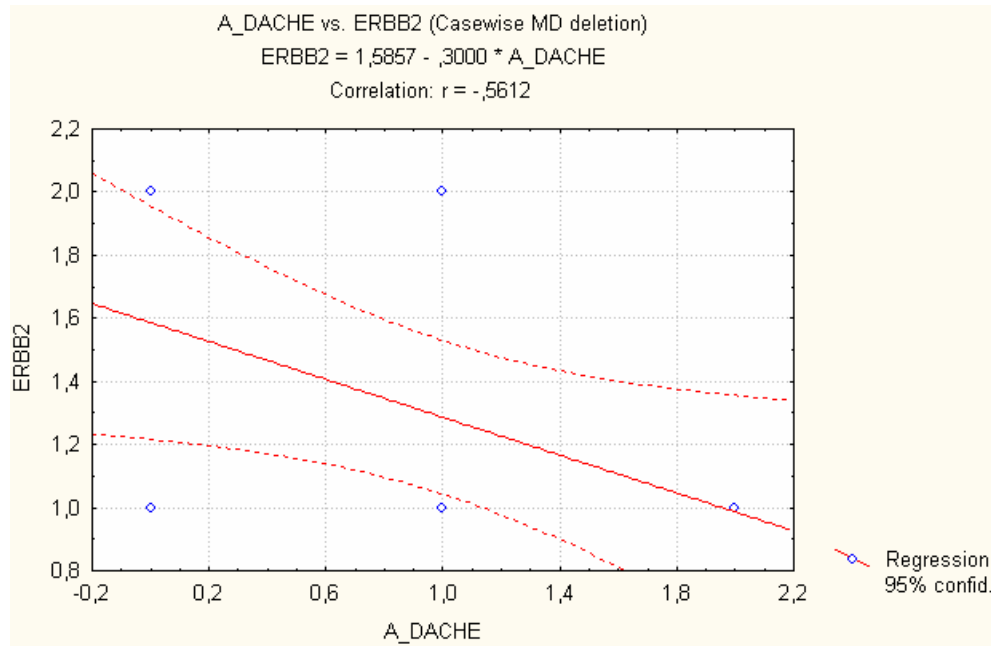


Gráfico 16. Correlação entre a variável amplificação do protooncogene *ERBB2* e a variável amplificações e deleções encontrada para o gene *ACHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. $ERBB2 = \text{Gene } ERBB2$: 1 = Inalterado; 2 = Amplificado; $A_DACHE =$ Amplificações e deleções do gene *ACHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=14).

As alterações (amplificações + deleções) do gene *BCHE* apresentaram uma correlação positiva com o grau histológico dos tumores, tanto quando se consideraram todas as amostras (40%, $p < 0,05$) (Gráficos 17 e 18), como quando as de comportamento diferente foram retiradas da análise (48%, $p < 0,05$) (Gráfico 19). Para o gene *ACHE* também foi observada essa correlação, no entanto, ela foi significativa somente quando se consideraram todas as amostras (39%, $p < 0,05$) (Gráficos 20 e 21). A correlação com o grau histológico dos tumores não foi significativa para nenhum dos genes quando foram consideradas as variáveis quantidade relativa e amplificações e deleções.

Outras correlações foram observadas apenas para o gene *BCHE*. As variáveis quantidade relativa e amplificações e deleções desse gene apresentaram uma correlação positiva com a variável uso de pílula anticoncepcional (na qual se atribuiu o valor “1” para o fato de as pacientes não tomarem pílula anticoncepcional e “2” para o fato de tomarem esse contraceptivo) de 66% (Gráfico 22) e 64% (Gráfico 23), respectivamente (com $p < 0,05$ para ambas). A variável amplificações e deleções do gene *BCHE* ainda apresentou correlação positiva de 64% ($p < 0,05$) com a variável idade da primeira gravidez (Gráfico 24). Estas correlações foram observadas somente quando o grupo amostral considerado foi o de 42 pacientes.

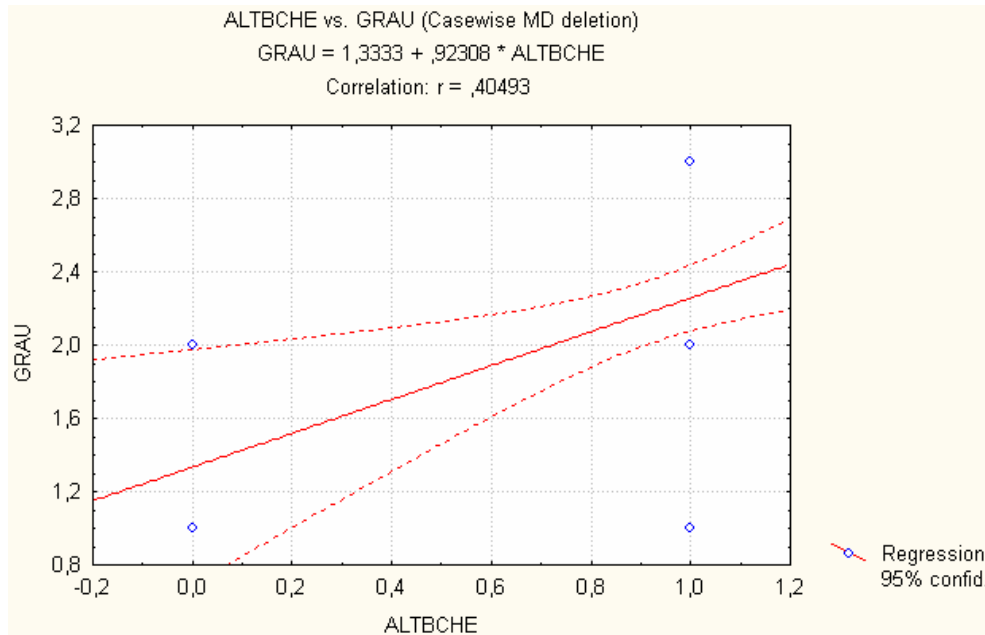


Gráfico 17. Correlação entre a variável grau histológico do tumor e a variável alterações do gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. GRAU = Grau histológico do tumor, classificado em I, II e III; ALTBCHE = Alterações do gene *BCHE* (amplificações + deleções): 0 = sem alteração; 1 = com alteração. (N=42).

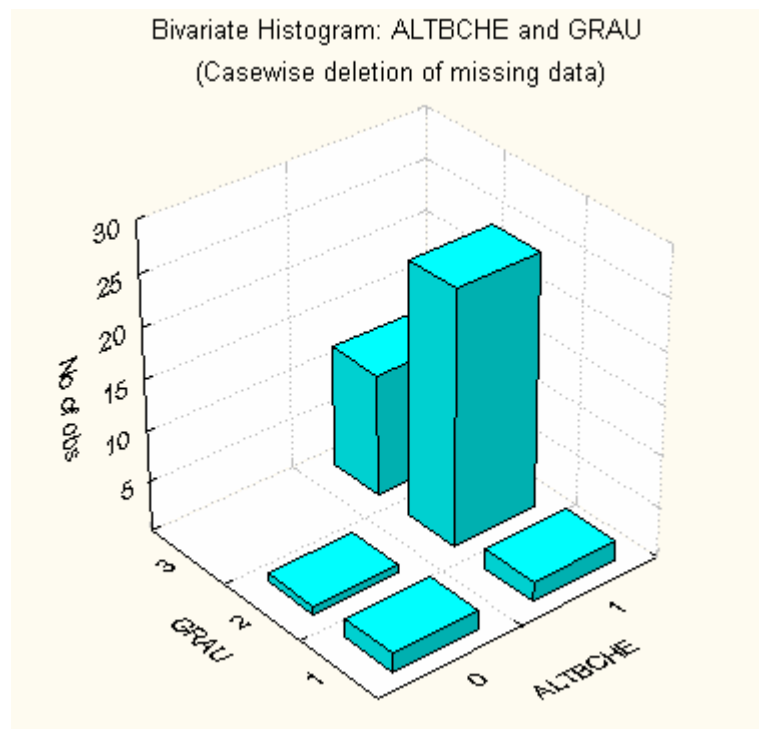


Gráfico 18. Grau histológico do tumor x alterações do gene *BCHE*, considerando-se todas as amostras. GRAU = Grau histológico do tumor, classificado em I, II e III; ALTBCHE = Alterações do gene *BCHE* (amplificações + deleções): 0 = sem alteração; 1 = com alteração. (N=42).

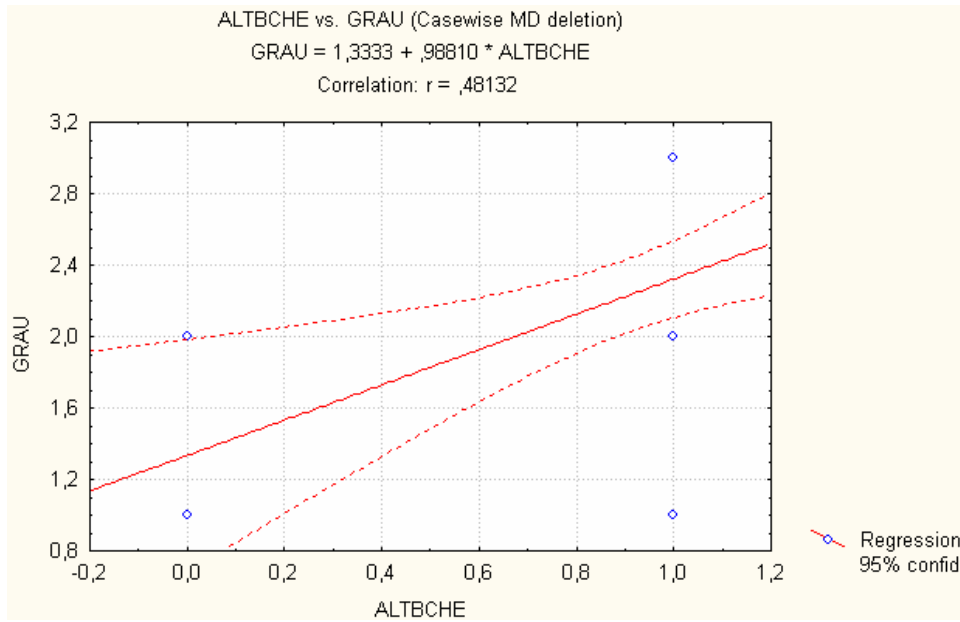


Gráfico 19. Correlação entre a variável grau histológico do tumor e a variável alterações do gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. GRAU = Grau histológico do tumor, classificado em I, II e III; ALTBCHE = Alterações do gene *BCHE* (amplificações + deleções): 0 = sem alteração; 1 = com alteração. (N=31).

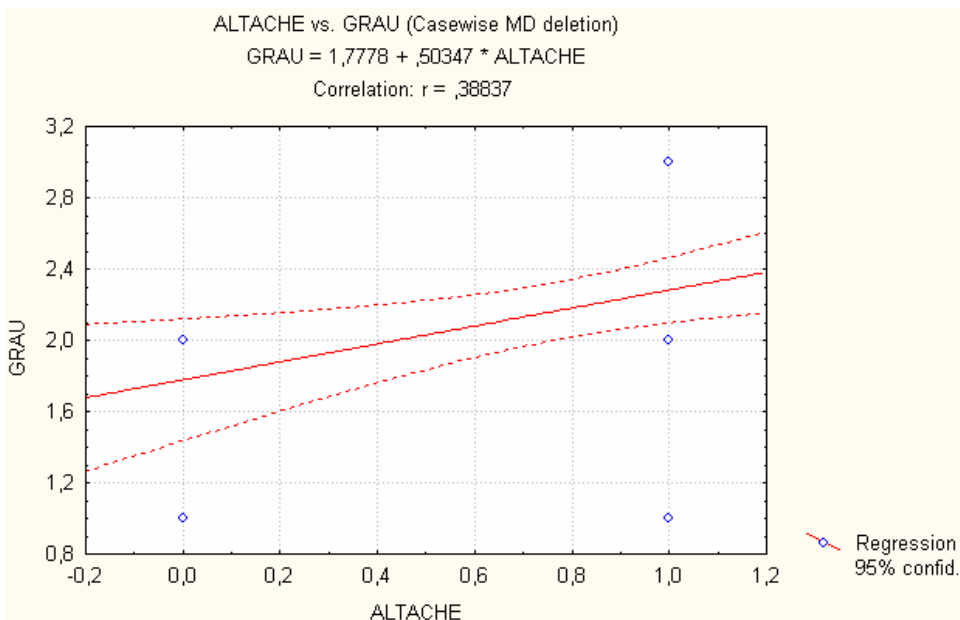


Gráfico 20. Correlação entre a variável grau histológico do tumor e a variável alterações do gene *ACHE*, considerando-se todas as amostras. GRAU = Grau histológico do tumor, classificado em I, II e III; ALTACHE = Alterações do gene *ACHE* (amplificações + deleções): 0 = sem alteração; 1 = com alteração. (N=41).

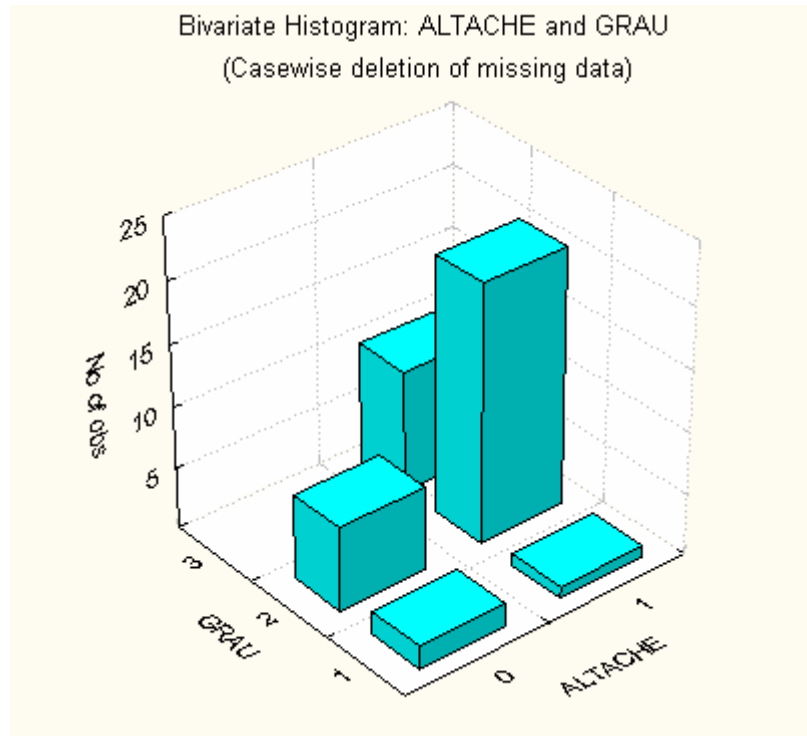


Gráfico 21. Grau histológico do tumor x alterações do gene *ACHE*, considerando-se todas as amostras. GRAU = Grau histológico do tumor, classificado em I, II e III; ALTACHE = Alterações do gene *ACHE* (amplificações + deleções): 0 = sem alteração; 1 = com alteração. (N=41).

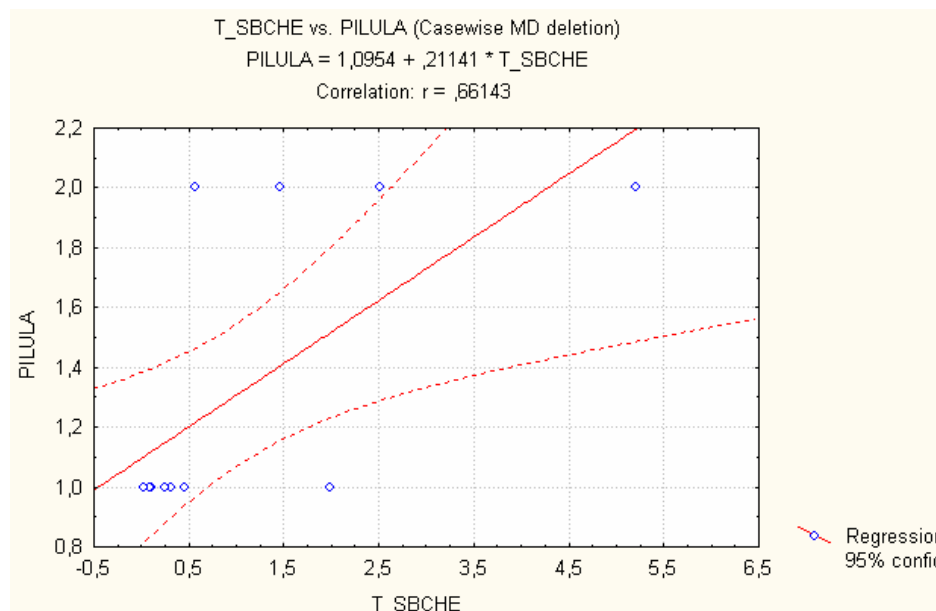


Gráfico 22. Correlação entre a variável uso de pílula anticoncepcional e a variável quantidade relativa do gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. PÍLULA = consumo de pílula anticoncepcional: 1 = não consumiu, 2 = consumiu; T_SBCHE = Relação $(Tumor_{CHE}/Tumor_{18S}) / (Sangue_{CHE}/Sangue_{18S})$ para o gene *BCHE*. (N=13).

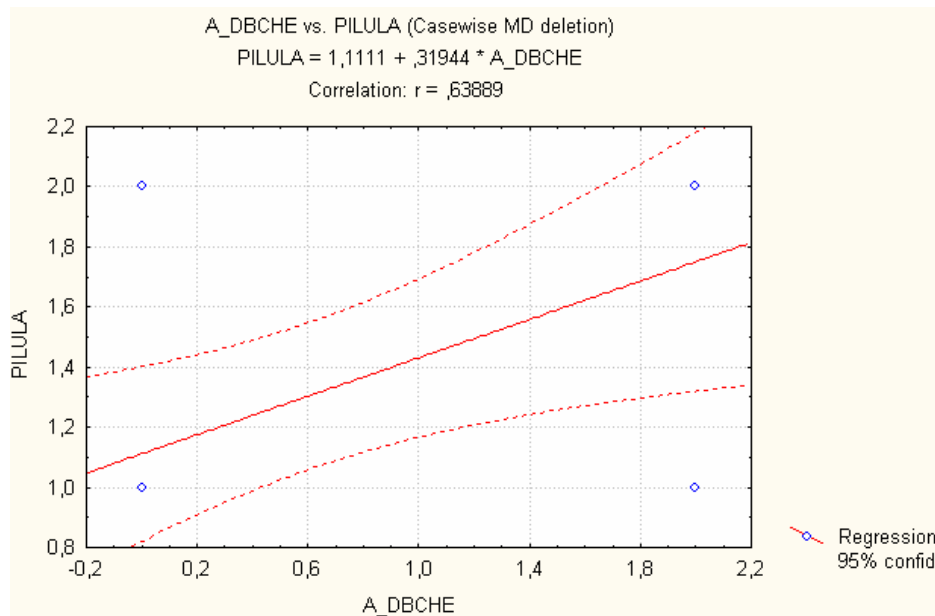


Gráfico 23. Correlação entre a variável uso de pílula anticoncepcional e a variável ampliações e deleções encontrada para o gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. PILULA = consumo de pílula anticoncepcional: 1 = não consumiu, 2 = consumiu. A_DBCHE = Ampliações e deleções do gene *BCHE*: 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=13).

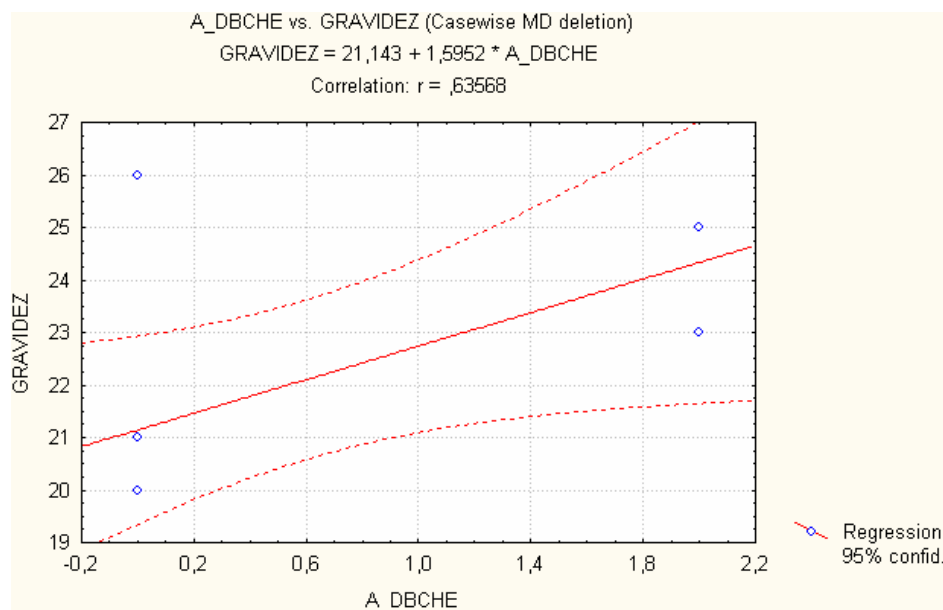


Gráfico 24. Correlação entre a variável idade da primeira gravidez e a variável ampliações e deleções encontrada para o gene *BCHE*, excluindo-se as amostras com comportamento diferente. GRAVIDEZ = Idade da primeira gravidez; A_DBCHE = Ampliações e deleções do gene *BCHE*; 0 = deleção; 1 = sem alteração; 2 = amplificação. (N=10).

Não foi encontrada correlação entre as variáveis dos genes das colinesterases e as variáveis idades de menarca, de menopausa e de primeira gravidez, número de filhos, presença ou ausência de receptores hormonais (estrógenos e progesterona), presença ou ausência de metástase nos linfonodos axilares e tipo histológico.

6. DISCUSSÃO

6.1 PCR em Tempo Real

O método de PCR em tempo real tem se mostrado uma ferramenta poderosa em análises quantitativas, tanto de DNA, para a verificação de alterações no número de cópias (BIÈCHE *et al.*, 1998; KÖNIGSHOFF *et al.*, 2003), bem como de RNA, para a averiguação de alterações na expressão gênica (NIKITINA *et al.*, 2003; SCHOSTAK *et al.*, 2006). Essa metodologia permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR convencional, a qual apresenta somente resultados qualitativos e ainda requer a detecção em gel, após eletroforese (NOVAIS, PIRES-ALVES & SILVA, 2004).

Nesse estudo, utilizou-se a PCR em tempo real para verificar a possível amplificação e/ou deleção dos genes das colinesterases, *BCHE* e *ACHE*, em cânceres de mama esporádicos. Inicialmente, foram utilizadas 202 amostras; destas, apenas 110 puderam ser aproveitadas para a análise estatística, sendo que 13 foram consideradas com ressalva, por apresentarem uma cinética de amplificação um pouco diferente, como já mencionado anteriormente.

Segundo Bomjen *et al.* (citado por BUSTIN & NOLAN, 2004), a qualidade das amostras possivelmente é o determinante mais importante da reprodutibilidade e da relevância biológica dos resultados subsequentes de uma PCR quantitativa; qualquer problema que afete essa reprodutibilidade, e como consequência, os resultados, provavelmente está relacionado com essa característica. Acredita-se que as amostras que não amplificaram ou não mostraram boa reprodutibilidade neste estudo possivelmente apresentavam certo grau de degradação, ou ainda continham substâncias inibidoras. De acordo com Besseti (2007), estas interagem diretamente com o DNA ou com a enzima DNA polimerase, interferindo na amplificação, e podem resultar de excessos de reagentes utilizados na extração do DNA, tais como KCl, NaCl, SDS, etanol, isopropanol e fenol. Observou-se que dentre as amostras que apresentaram problemas na amplificação e tiveram que ser descartadas, 83,78% tratavam-se de DNA tumoral, e apenas 16,21% de DNA de sangue; dentre as amostras que foram consideradas para a análise estatística mas com ressalvas, 64,70% correspondiam a amostras tumorais e 35,29% a amostras do tecido sangüíneo ($p < 0,001$). Uma possível explicação para esse fato é a diferença na

metodologia de extração do material genético dos dois tecidos: o de sangue foi extraído pelo método *salting out* e o de tumor pelo método do fenol-clorofórmio.

A presença de inibidores pôde ser suspeitada porque o método de amplificação empregado foi a PCR em tempo real. Uma PCR convencional não permite essa observação, pois realiza leituras “*end point*”, mostrando apenas o obtido na fase platô. A Figura 12, por exemplo, ilustra as curvas de uma amostra em triplicata. Observa-se que, embora não haja a menor reprodutibilidade, tanto a linha azul quanto a amarela teriam uma quantidade de produto detectada ao final da reação.

A eficiência de uma PCR depende de vários fatores, entre eles os cuidados no preparo das reações, a qualidade do DNA/RNA, a possível presença e a concentração de inibidores, o desenho dos iniciadores, tamanho do fragmento a ser amplificado, condições de termociclagem etc, e deveria ser em torno de 100%, com *slopes* entre -3,6 a -3,1 (APPLIED BIOSYSTEMS, ABI Expert training Center; DORAK, 2006). Na Tabela 3, observa-se que apenas uma placa (do gene *BCHE*) teve um *slope* maior que -3,1, no entanto muito próximo desse valor (-3,06); as demais ficaram dentro do intervalo de *slopes* mencionado. Com relação à eficiência, algumas reações apresentaram um valor um pouco maior que 100%; acredita-se que seja devido à presença de contaminantes em algumas amostras.

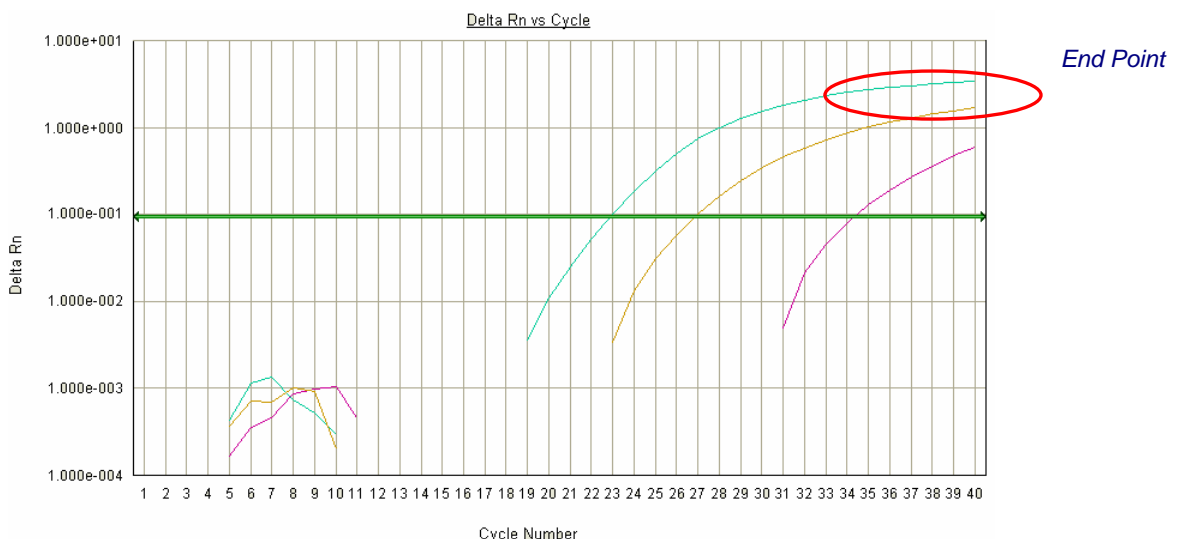


Figura 12. Exemplo de amostra com substâncias inibidoras. Observa-se que não há a menor reprodutibilidade dentro dessa triplicata. Se a mesma amostra fosse submetida a uma PCR convencional, não seria detectada a presença de inibidores, já que a leitura seria apenas da fase platô (*end point*).

6.2 Controles Negativos e Temperaturas de Melting

O fluoróforo utilizado neste trabalho foi o *SYBR Green*, o qual apresenta uma boa sensibilidade e fácil utilização (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004). Outra característica desta molécula fluorescente é a capacidade de se ligar a toda e qualquer dupla fita gerada na reação, o que pode resultar em um controle negativo (CN) emitindo fluorescência devido à sua ligação a dímeros de oligonucleotídeos iniciadores (BUSTIN *et al.*, 2004). Para a realização de um controle dessas ampliações inespecíficas, faz-se a curva de dissociação e o gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido à diferença das temperaturas de *melting* (T_m) de cada produto, de acordo com o número e composição de bases.

Neste estudo, mesmo com as tentativas de se eliminar qualquer amplificação dos CNs (testaram-se diferentes concentrações dos iniciadores, diferentes temperaturas e tempos da fase de extensão, preparo das placas dentro e fora do fluxo laminar, e até mesmo diferentes equipamentos de PCR em tempo real), os CNs de todas as placas foram positivos e apresentaram uma T_m igual à T_m dos fragmentos amplificados do gene da placa em que se encontravam.

Segundo Bustin *et al.*, (2004) a questão de como interpretar um CN positivo é assunto de infundáveis debates. Eles acreditam que um CN com um C_T menor que 30 indica a presença de elevados níveis de contaminação em algum lugar do laboratório e o preparo da reação requer atenção urgente, mas ao mesmo tempo dizem que não há nada muito definitivo nestas situações, e sugerem que qualquer amostra que tenha mais de cinco C_T s de diferença do CN provavelmente pode ser considerada como não estando contaminada, especialmente quando as replicatas do CN também foram positivas e apresentaram C_T s similares. Conforme mostram os Gráficos 1 e 2 (página 51), a grande maioria dos CNs apresentou C_T maior do que 30 e uma diferença entre a média de C_T s dos CNs e a média de C_T s da amostra de maior C_T da mesma reação foi de pelo menos 5. Ocorreram apenas duas exceções. Como pode ser observado no Gráfico 1, a placa 7 apresentou uma média de C_T s dos CNs de 29,17. Porém, a diferença entre as médias dos C_T s dos CNs e as médias dos C_T s de amostras de maior C_T foi de 12,59, como mostra o Gráfico 2 (e a Figura 9 na pág.48); por esse motivo decidiu-se utilizar este dado. A outra exceção foi a amostra de maior C_T da placa 10, a qual apresentou uma diferença entre a média de C_T s do CN e a sua média de C_T s de apenas 3,80 (Gráfico2). Esta foi

analisada com ressalvas, e incluída no grupo das amostras com comportamento diferente.

6.3 Amplificações e deleções dos genes *BCHE* e *ACHE*

A alteração do número de cópias gênicas está presente na maioria dos cânceres de mama, com uma média de 6,7 aberrações por caso, e está associada ao desenvolvimento e à progressão dessa neoplasia. As alterações mais freqüentes são as amplificações e as deleções (BUERGER *et al.*, 1999; FOROZAN *et al.*, 2000).

Amplificações gênicas são mutações que resultam em múltiplas cópias de um gene em uma região cromossômica ampliada; desempenham um importante papel na patogênese de diversos tumores sólidos, inclusive no câncer de mama, provavelmente por que a superexpressão de alguns genes críticos confere uma vantagem seletiva (KALLIONIEMI, 1994; BIÈCHE *et al.*, 1998; MYLIKANGAS, 2006). Já as deleções são perdas de um segmento qualquer do cromossomo, que não inclua o centrômero (GUERRA, 1988). Estão envolvidas na perda de função de genes supressores de tumor (OLIVEIRA, ROSS & FLETCHER, 2005).

Diversos estudos já mostraram que os genes das colinesterases estão estruturalmente alterados, ou se expressam de modo atípico em uma série de tipos tumorais, tais como gliomas (VIDAL, 2005), carcinomas primários de ovário (ZAKUT *et al.*, 1990), leucemias (LAPIDOT *et al.*, 1989) e câncer de pulmão (BRASS *et al.*, 1997). Há relatos ainda de amplificações da região 3q - na qual se situa o gene *BCHE* - em cânceres de próstata (JUNG *et al.*, 2006) e em cânceres de cabeça e pescoço (HIBI *et al.*, 2000), e deleções da região 7q - onde está situado o gene *ACHE* - em leucemias (STEPHENSON *et al.*, 1996).

Neste estudo, investigou-se a possível amplificação ou deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* em tumores de mama esporádicos. Conforme os Gráficos 3 a 6, grande parte das pacientes portadoras dessa neoplasia apresentaram os genes das colinesterases alterados nos tecidos tumorais. Observou-se um maior número de deleções - 56,36% e 43,64% para os genes *BCHE* e *ACHE*, respectivamente - do que amplificações - 23,64% para ambos - quando N=55. Para N=42 essa observação também foi verdadeira, embora com valores um pouco diferentes (deleções: 54,76% para o *BCHE* e 38,10% para o *ACHE*; amplificações: 19,05% para o *BCHE* e 26,19% para o *ACHE*). Ainda analisando a amostra em que N=42, percebe-se que o número de pacientes com o gene *ACHE* inalterado é o dobro do

número das pacientes com o gene *BCHE* inalterado (19,4% e 9,52%, respectivamente) ($p > 0,20$), e que foi encontrado um maior número de ampliações do gene *ACHE* do que do gene *BCHE* ($p > 0,30$), e o contrário para os casos de deleção, mais no gene *BCHE* do que no *ACHE* ($p > 0,20$); no entanto, essas diferenças não foram significativas. As diferenças entre os valores obtidos para os distintos tamanhos amostrais não foram estatisticamente significativas.

Embora os genes das colinesterases estejam situados em cromossomos diferentes - o gene *BCHE* está localizado na região 3q26.1-q26.2, e o *ACHE* na região 7q22 - observou-se uma correlação positiva entre os casos de deleção e amplificação dos mesmos, bem como entre as suas quantificações relativas. Alguns autores afirmam que cada alteração genética é crítica para o desenvolvimento de clones de células com um comportamento diferente e uma vantagem seletiva de crescimento, e quando ocorrem juntas em uma única célula da mama, desregulam o sistema de controle até o ponto em que as células passam a funcionar autonomamente, de maneira irregular e imprevisível, proporcionando um terreno fértil para outras mutações ocorrerem. A replicação contínua dessas células resulta na formação de grupos celulares anormais com um acúmulo de mutações e, portanto, com um maior potencial neoplásico (HODGSON & EVANS, 1998; WREN, 2007).

Já foi observado que alguns genes amplificam após exposição à quimioterápicos, e que essa alteração favorece a sobrevivência da célula (SCHIMKE, BROWN & CKAUFMAN, 1982). Soreq & Zakut (1990) acreditam que os genes das colinesterases se encaixam nessa categoria, e que seus produtos protéicos são importantes para a sobrevivência, divisão ou crescimento de células tumorais, hematopoéticas e germinativas. Stephenson *et al.* (1996) também acreditam que algumas drogas anti-câncer possam ter efeito sobre as colinesterases, e influenciem os eventos de amplificação dos genes dessas enzimas. De fato, já foi demonstrado que derivados do camptotecin - uma droga utilizada no tratamento do câncer - atuam como inibidores da acetilcolinesterase (KAWATO *et al.*, 1993). Todavia, alguns autores acreditam que essa amplificação não seja uma causa da exposição aos quimioterápicos, e sim que os produtos dos genes amplificados apresentem uma maior resistência à ação das drogas, alterando a absorção das mesmas, interferindo na metabolização ou conjugação ou por meio de outros mecanismos (O'DRISCOLL & CLYNES, 2006).

Soreq & Zakut ainda fazem menção de que a amplificação não é o único mecanismo capaz de aumentar a sobrevivência da célula após a exposição de compostos químicos, mas que mutações que ocorrem no domínio estrutural do gene que codifica a proteína alvo do inibidor, ou que ocorrem na região promotora desse gene e aumenta a produção de proteína alvo sem a necessidade de uma amplificação, ou ainda que altere o transporte através da membrana celular, impedindo o alcance da proteína alvo pelo inibidor, também podem gerar células resistentes à ação de drogas. Contudo, as alterações das colinesterases aqui verificadas não podem ser atribuídas à ação de medicamentos, pois as pacientes que compuseram o grupo amostral não tinham dado início a qualquer tipo de tratamento.

Há ainda outras explicações aceitáveis para a amplificação encontrada em alguns tumores. Zakut *et al.* (1990) observaram uma amplificação tanto do gene *BCHE* quanto do gene *ACHE* em tumores de ovários, e propuseram dois possíveis mecanismos para explicar esse fato. O primeiro seria uma amplificação “acidental” por esses genes residirem próximo a um protooncogene que sofreu amplificação. O segundo seria devido ao fato de as seqüências amplificadas conterem origens internas de replicação, o que tornaria possível sua amplificação independente sob certas circunstâncias. Os mesmos autores ainda mencionam que tumores que apresentam os oncogenes *c-raf1*, *v-sis* e *c-fes* amplificados, também possuem altos níveis dos genes *BCHE* e *ACHE*; por outro lado, já foram observadas amostras tumorais com os genes das colinesterases amplificados, mas não oncogenes, e propõem que talvez os genes das colinesterases sejam amplificados mais precocemente que os oncogenes na tumorigênese.

Talvez os genes das colinesterases realmente estejam localizados próximos a protooncogenes. Alguns estudos sugerem que os genes *PIK3CA*, *ECT2*, *EVI1*, localizados na região 3q26, e o gene *MET*, localizado na região 7q3, atuem como oncogenes. Shayesteh *et al.* (1999) acreditam que o *PICK3CA*, o qual codifica a proteína fosfatidilinositol 3-quinase que, por sua vez, participa da regulação da proliferação, adesão e motilidade celular, é um oncogene que desempenha um importante papel no câncer de ovário, estando amplificado em 40% dos casos. Também já foram identificadas mutações nesse mesmo gene em tumores de mama, de cólon, de pulmão, gástricos e em glioblastomas (SAMUELS *et al.*, 2004). O *ECT2* (*epithelial cell transforming sequence*) representa uma classe de oncogenes cujos produtos estão relacionados à regulação das proteínas da superfamília Ras de

GTPases, as quais estão envolvidas no processo de mitose (TAKAI *et al.*, 1994). Sobre o oncogene *EVI1* (*ecotropic viral integration site-1*), já foi observado que os níveis de RNA do seu transcrito estão aumentados em 83% em cânceres de ovário, sugerindo uma contribuição desse gene na patofisiologia desta neoplasia; ele também parece estar envolvido na leucemia mielóide aguda (NANJUNDAN *et al.*, 2007). Com relação à região 7q, já foi observada a presença do oncogene *MET*, o qual está relacionado com proteínas quinases de outros oncogenes e receptores de fatores de crescimento. Parece estar envolvido em carcinomas de células renais e hepatócitos (DEAN *et al.*, 1985).

Trabalhos sobre a alteração do número de cópias gênicas em câncer de mama utilizando a técnica de CGH (Comparative Genomic Hybridization) já demonstraram haver ampliações nas regiões cromossômicas 3q e 7q (KALLIONIEMI *et al.*, 1994; FOROZAN *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2006), e também deleções da região 3q (LU *et al.*, 1997). Tendo em vista esses dados, pode-se supor que não ocorra uma amplificação ou deleção específica do gene das colinesterases, como mostram os resultados aqui obtidos, mas sim a de uma região cromossômica um pouco mais ampla.

Estudos sobre as colinesterases em câncer de mama mostraram um significativo aumento (quase o dobro) da atividade da AChE e uma diminuição de 65% da atividade da BChE, mostrando que os níveis de AChE e BChE são afetados de maneiras opostas pela neoplasia (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002). Considerando-se que, teoricamente, as ampliações e as deleções aumentam e diminuem, respectivamente, a expressão gênica dos seus produtos, os dados acima vão contra os obtidos nesse estudo, o qual mostrou uma correlação positiva entre as ampliações e deleções dos genes *BCHE* e *ACHE*. No entanto, alguns autores levantaram a hipótese de que a alteração da atividade das colinesterases em tumores pode ser resultado de um aumento na degradação e/ou liberação dessas enzimas (VIDAL, 2005), não estando relacionada apenas à alteração gênica.

A variação oposta das atividades da AChE e da BChE em cânceres de mama (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002), a forte diminuição da atividade da AChE mas não da BChE em linfonodos metastásicos (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2003), o declínio de ambas em cânceres de cólon (MONTENEGRO *et al.*, 2005), a diminuição da atividade da AChE em cânceres de pulmão, a não alteração da mesma em adenocarcinomas (MARTINEZ-MORENO *et al.*, 2006), bem como a amplificação da região 3q26.1-q29

em cânceres de mama (PIERGA *et al.*, 2007) e de pulmão (TONON *et al.*, 2005), deleções do segmento 3q26.3-q27 em cânceres medulares da tireóide (MARSH *et al.*, 2003), deleções da região 7q22 em síndromes mielodisplásicas e leucemias miéloides agudas (STEPHENSON, 1996) e amplificação da 7q em tumores de mama (FOROZAN *et al.*, 2000) sugerem que o efeito do câncer na atividade das ChEs depende das anormalidades genéticas e biológicas desenvolvidas no tipo particular de célula na qual o tumor surgiu.

Nota-se que nenhuma relação causal foi ainda firmemente estabelecida entre a expressão das colinesterases e o desenvolvimento de tumores. Assim como a expressão dos genes *BCHE* e *ACHE* é contra regulada durante o desenvolvimento do sistema nervoso, um fenômeno semelhante poderia ser esperado na transformação neoplásica. Entretanto, o que é verdade no desenvolvimento do sistema nervoso não é necessariamente verdade na tumorigênese. Pode-se supor que a mudança de atividade das colinesterases em tumor seja uma consequência das transformações neoplásicas e que ela contribua de alguma forma para a manutenção do processo tumorigênico.

6.4 Correlações das amplificações e deleções dos genes *ACHE* e *BCHE* com os dados clínico-histopatológicos

O método padrão para definir o prognóstico de pacientes com câncer de mama inclui algumas características clínico-histopatológicas, tais como tamanho do tumor, grau histológico, envolvimento dos linfonodos, presença de receptores hormonais e superexpressão do gene *ERBB2* (CHIURI, LEO & LORUSSO, 2007). Tendo isso em vista, confrontamos os dados obtidos nesse estudo, relativos aos genes das colinesterases, com as informações obtidas das pacientes.

O gene *ERBB2* é um oncogene membro da família dos receptores de tirosina quinase ErbB e desempenha um importante papel na patogênese do câncer de mama. A amplificação e/ou superexpressão desse gene tem sido descrita em 20-30% dos carcinomas invasores de mama e está associada a tumores com um fenótipo particularmente agressivo (SLAMON *et al.*, 1987; BOGLIOLO, 2006). Foi encontrada uma correlação negativa entre a variável amplificação e deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* e a variável amplificação do protooncogene *ERBB2*, mostrando que o gene *ERBB2* encontra-se amplificado com maior frequência quando os genes das colinesterases estão deletados (Gráficos 13 e 15, e Tabela 5).

Pierga *et al.* (2007) já observaram uma maior frequência de deleções das regiões 5q33.3-q4 e 18p11.31 em tumores com o gene *ERBB2* amplificado, também em cânceres de mama. Segundo Vanden-Bempt, Drijkoningen & De Wolf-Peeters (2007), as alterações genéticas associadas com a amplificação do *ERBB2* em cânceres de mama são bastante heterogêneas. Eles acreditam que a amplificação desse gene seja um evento complexo que desestabiliza o genoma tumoral, facilitando a geração de outras aberrações genômicas, tanto (co) amplificações quanto deleções.

Foi observada ainda uma correlação positiva entre o grau histológico dos tumores das pacientes e as alterações (amplificações + deleções) de ambos os genes das colinesterases; para o gene *BCHE* essa correlação foi positiva tanto para N=55 (40%) quanto para N=42 (49%); já para o gene *ACHE* ela foi positiva somente quando N=55 (39%), embora houvesse uma tendência de o mesmo ocorrer quando N=42 (33%). Há evidências de que o grau histológico do tumor aumenta de I (bem diferenciado e com crescimento lento) para II e III (moderadamente diferenciado e indiferenciado com uma alta proliferação, respectivamente) conforme o câncer progride, sendo que o grau III, portanto, apresenta uma instabilidade genômica maior e um maior acúmulo de alterações (ELLSWORTH *et al.*, 2007; 2008). Buerger *et al.* (1999), analisando o genoma por completo, também encontraram uma correlação positiva entre o grau histológico e o número de alterações genéticas em câncer de mama: nos carcinomas de grau I, foi encontrada uma média de 3,6 aberrações por caso e amplificações foram detectadas em 18%; os tumores de grau II continham uma média de 6,4 aberrações, com 25% apresentando amplificações, e os de grau III, apresentaram uma média de 8,4 aberrações por caso, 38% de amplificações.

Além disso, verificou-se uma correlação positiva entre a variável tamanho do tumor e a variável amplificações e deleções do gene *ACHE* (48%). Quanto maior o tumor, maior é o número de células malignas e maior a probabilidade de surgirem clones com capacidade metastática (BOGLIOLO, 2006). Acredita-se que a variável tamanho do tumor possa estar relacionada com o grau histológico, pois em estudos realizados, Duffy *et al.* (1991) observaram que a proporção de cânceres com menor grau de malignidade era menor para tumores com diâmetro menor que 15 cm do que para os com um diâmetro maior do que 30 cm. Meyer, Fahrner & Daniel (1999) verificaram que os pequenos carcinomas invasivos de mama, os quais possuem no

máximo 1 cm de diâmetro, preponderantemente apresentam também o menor grau histológico.

Para o gene *BCHE* ainda foram encontradas correlações entre a variável uso de pílula anticoncepcional e as variáveis quantidade relativa e amplificação e deleção desse gene, e também entre esta última e a variável idade da primeira gravidez. Em estudo de Schönborn, Nischán & Ebeling (1994), foi constatado que as pacientes com câncer de mama que utilizaram o contraceptivo oral apresentavam uma maior porcentagem de tumores indiferenciados (grau III). Já foi observado também que mulheres que tiveram a primeira gravidez antes dos 20 anos são mais propensas a terem tumores de maior grau que as mulheres que não tiveram filhos (LARGENT, ZIOGAS & ANTON-CULVER, 2005). Todavia, os dados deste estudo relativos a essas variáveis não podem ser conclusivos, já que devido à falta de informações clinico-histopatológicas o tamanho amostral foi muito pequeno (N=13 para a variável pílula anticoncepcional e N=10 para a variável idade da primeira gravidez).

Todas essas características clinico-histopatológicas são fundamentais para o prognóstico do câncer de mama e, como mostram os dados, algumas delas estão relacionadas à alteração do número de cópias gênicas, talvez não especificamente a dos genes das colinesterases, mas a de uma região cromossômica mais ampla, nos quais estes estão incluídos. A incidência crescente, a heterogeneidade biológica e a alta taxa de mortalidade do câncer de mama tornam muito valioso qualquer esforço no sentido de se identificarem elementos que possam melhorar o comportamento dessa neoplasia, a forma de definir fatores prognósticos ou, até mesmo, a resposta aos tratamentos.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos na análise de amostras de tecidos sangüíneos e tumorais de mama de 55 pacientes por meio do método de PCR em tempo real, concluiu-se que:

- Os genes *ACHE* e *BCHE* estão alterados (amplificados ou deletados) na maioria dos casos de câncer de mama esporádico.
- As alterações em ambos os genes estão correlacionadas entre si.
- A amplificação do oncogene *ERBB2* está correlacionada com a deleção dos genes *ACHE* e *BCHE*.
- O número de alterações nos genes das colinesterases aumenta conforme aumenta o grau de malignidade do tumor.

8. REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; REA, R.R.; SUP LICY, H.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Forum of the European Societies of Clinical Chemistry**, Berlim, v.43, n.3, p.285-288, 2005.

ALLDERDICE, P.W.; GARNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N., MCALPINES, J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, San Diego, v.11, n.2, p.452-454, 1991.

ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase k-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. **Journal of Neurochemistry**, Philadelphia, v.74, n.2, p.869-877, 2000.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2007**. Atlanta: American Cancer Society, 2007. Disponível em: <
<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf> > Acesso em Dezembro de 2007.

APPLEYARD, M.E. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. **Trends in Neuroscience**, Amsterdã, v.15, n.12, p.485-490, 1992.

APPLIED BIOSYSTEMS, ABI Expert training Center. Apostila fornecida no curso : Expressão gênica empregando PCR quantitativo.

APPLIED BIOSYSTEMS: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS: Quantifiler kits. São Paulo, 2006. Disponível em: <
<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf> > Acesso em Dezembro de 2007.

ARPAGAUS, M.; KOTT, S.M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, Washington, v.29, n.1, p.124-131, 1990.

ARPAGAUS, M.; CHATONNET, A.; MASSON, P.; NEWTON, M.; VAUGHAN, T.A.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.266, n.11, p.6966-6974, 1991.

BALASUBRAMANIAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **The FASEB Journal : official publication of the Federation of**

American Societies for Experimental Biology, Bethesda, v.7, n.14, p.1354-1358, 1993.

BALASUBRAMANIAN, A.S. Amyloid beta peptide, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase. **Neurochemical Research**, Nova Iorque, v.26, n.4, p.453-456, 2001.

BARBOSA, M.; RIOS, O.; VELASQUEZ, M.; VILLALOBOS, J.; EHRMANN, J. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors. **Surgical Neurology**, Tryon, v.55, n.2, p.106-112, 2001.

BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.50, n.5, p.1104-1114, 1992.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.50, n.5, p.1086-1103, 1992.

BEN AZIZ-ALOYA, R.; STERNFELD, M.; SOREQ, H. Promoter elements and alternative splicing in the human *ACHE* gene. **Progress in Brain Research**, Amsterdã, v.98, pp.147-153, 1993.

BESSETI, J. An introduction to PCR inhibitors. **Profiles in DNA**, v.4, 2007. Disponível em: < http://www.promega.com/profiles/1001/1001_09.html > Acesso em Dezembro de 2007.

BETZ, H.; BOURGEOIS, J. P.; CHANGEUX, J.P. Evolution of cholinergic proteins in developing slow and fast skeletal muscles in chick embryo. **The Journal of Physiology**, Londres, v.302, p.197-218, 1980.

BIÈCHE, I.; OLIVI, M.; CHAMPÈME, M.H.; VIDAUD, D.; LIDEREAU, R.; VIDAUD, M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. **International Journal of Cancer**, Nova Iorque, v.78, p.661-666, 1998.

BIGBEE, J.W.; SHARMA, K.V.; GUPTA, J.J.; DUPREE, J.L. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.S1, p.81-87, 1999.

BIGNON, J.D.; FERNÁNDEZ-VIÑA, M.A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplifications by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In: Charron D, ed. **Genetic diversity of HLA: Functional and medical implication**, Paris, 584-95, 1997.

BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, Cambridge, v.64, p.235-248, 1991.

BLANQUICETT, C.; JOHNSON, M.R.; HESLIN, M.; DIASIO, R.B. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. **Analytical Biochemistry**, Nova lorque, v.303, p.209–214, 2002.

BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia**/[editor] FILHO, G.B. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.637-638, 2006.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; RADIC, Z.; MARCHOT, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. **The EMBO Journal**, Oxford, v.22, n.1, p.1-12, 2003.

BRASS, N.; RACZ, A.; HECKEL, D.; REMBERGER, K.; SYBRECHT, G.W.; MEESE, E.U. Amplification of the genes *BCHE* and *SLC2A2* in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. **Cancer Research**, Chicago, v.57, n.11, p.2290-2294, 1997.

BROOMFIELD, C.A.; MAXWELL, D.M.; SOLANA, R.P.; CASTRO, C.A.; FINGER, AV; LENZ, DE. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.259, n.2, p.633-638, 1991.

BROWN, L.M.; BLAIR, A.; GIBSON, R.; EVERETT, G.D.; CANTOR, K.P.; SCHUMAN, L.M.; BURMEISTER, L.F.; VAN LIER, S.F.; DICK, F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. **Cancer Research**, Chicago, v.50, n.20, p.6585-6591, 1990.

BUERGER, H.; OTTERBACH, F.; SIMON, R.; SCHAFFER, K.L.; POREMBA, C.; DIALLO, R.; BRINKSCHMIDT, C.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; BOECKER, W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. **The Journal of Pathology**, Londres, v.189, n.4, p.521-526, 1999.

BURDALL, S.E.; HANBY, A.M.; LANSDOWN, M.R.; SPEIRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, Londres, v.5, n.2, p.89-95, 2003.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, Santa Fé, v.15, p.155-166, 2004.

BYTYQI, A.H.; LOCKRIDGE, O.; DUYSSEN, E.; WANG, Y.; WOLFRUM, U.; LAYER, P.G. Impaired formation of the inner retina in an *AChE* knockout mouse results in degeneration of all photoreceptors. **The European Journal of Neuroscience**, Oxford, v.20, p.2953–2962, 2004.

CABELLO, G.; VALENZUELA, M.; VILAXA, A.; DURÁN, V.; RUDOLPH, I.; HREPIC, N.; CALAF, G. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous

pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.5, p.471-479, 2001.

CALAF, G.M.; PARRA, E.; GARRIDO, F. Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. **Oncology Reports**, Atenas, v.17, n.1, p.25-33, 2007.

CARMONA, G.N.; JUFER, R.A.; GOLDBERG, S.R.; GORELICK, D.A.; GREIG, N.H.; YU, Q.; CONE, E.J.; SCHINDLER, C.W. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.28, n.3, p.367-371, 2000.

CARR, J.A.; HAVSTAD, S.; ZARBO, R.J.; DIVINE, G.; MACKOWIAK, P.; VELANOVICH, V. The association of *HER-2/neu* amplification with breast cancer recurrence. **Archives of surgery**, Chicago, v.135, n.12, p.1469-1474, 2000.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal**, Londres, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

CHIURI, V.E.; LEO, G.; LORUSSO, V. Clinical and therapeutic perspectives of gene expression profiling for breast cancer. **Annals of Oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, Londres, v.18, Suppl 6, p.58-62, 2007.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. *Farmacologia Moderna*, 6ªed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.114, 2005.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews. Neuroscience**, Londres, v.4, n.2, p.131-138, 2003.

DEAN, M.; PARK, M.; LE BEAU, M.M.; ROBINS, T.S.; DIAZ, M.O.; ROWLEY, J.D.; BLAIR, D.G.; VANDE WOUDE, G.F. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. **Nature**, Londres, v.318, n.6044, p.385-388, 1985.

DeFELICE, E.A. *Breast Cancer: Web Resource Guide for Consumers, Healthcare Providers, Patients, and Physicians*. Editora iUniverse, 2002. Disponível em: <<http://books.google.com/books>> Acesso em Julho de 2006.

DORAK, M.T. *Real-Time PCR (Advanced Methods Series)*. Oxford: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>> Acesso em Dezembro de 2007.

DUFFY, S.W.; TABAR, L.; FAGERBERG, G.; GAD, A.; GRÖNTÖFT, O.; SOUTH, M.C.; DAY, N.E. Breast screening, prognostic factors and survival--results from the

Swedish two county study. **British Journal of Cancer**, Londres, v.64, n.6, p.1133-1138, 1991.

DUFLOTH, R.M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.K.; SHINZATO, J.Y.; SANTOS, C.C.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. Análise de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes brasileiros com carcinoma de mama e história familiar positiva. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo , v.123, n.4, 2005.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. **Toxicology**, Amsterdã, v.233, n.1-3, p.60-69, 2007.

DWEK, M.V.; BROOKS, S.A. Harnessing changes in cellular glycosylation in new cancer treatment strategies. **Current Cancer Drug Targets**, Hilversum, v.4, n.5, p.425-442, 2004.

EARL, C.J.; THOMPSON, R.H. Cholinesterase levels in the nervous system in tri-ortho-cresyl phosphate poisoning. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, Londres, v.7, n.4, p.685-694, 1952.

EDWARDS, J.A.; BRIMIJOIN, S. Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. **Journal of Neurochemistry**, Londres, v.38, n.5, p.1393-1403, 1982.

EHRlich, G.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; GINZBERG, D.; SINDEL, L.; SOREQ, H.; ZAKUT, H. Mapping the human acetylcholinesterase gene to chromosome 7q22 by fluorescent in situ hybridization coupled with selective PCR amplification from a somatic hybrid cell panel and chromosome-sorted DNA libraries. **Genomics**, San Diego, v.13, n.4, p.1192-1197, 1992.

ELLSWORTH, R.E.; ELLSWORTH, D.L.; LOVE, B.; PATNEY, H.L.; HOFFMAN, L.R.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Correlation of levels and patterns of genomic instability with histological grading of DCIS. **Annals of Surgical Oncology**, Nova Iorque, v.14, n.11, p.3070-3077, 2007.

ELLSWORTH, R.E.; HOOKE, J.A.; LOVE, B.; KANE, J.L.; PATNEY, H.L.; ELLSWORTH, D.L.; SHRIVER, C.D. Correlation of levels and patterns of genomic instability with histological grading of invasive breast tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v.107, n.2, p.259-265, 2008.

FABER, M. Serum cholinesterase in disease. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, v.114, p.59-71, 1943.

FAIRBROTHER, A.; WAGNER, S.L.; WELCH, S.; SMITH, B.B. Influence of menstrual cycle on serum cholinesterase. **Environmental Research**, Nova Iorque, v.49, n.2, p.181-189, 1989.

FILHO, V.W.; MONCAU, J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: Padrões regionais e tendências temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.48, n.3, p.250-257, 2002.

FITZPATRICK-MCELLIGOTT, S.; STENT, G.S. Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis*. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.1, n.8, p.901-907, 1981.

FOROZAN, F.; MAHLAMÄKI, E.H.; MONNI, O.; CHEN, Y.; VELDMAN, R.; JIANG, Y.; GOODEN, G.C.; ETHIER, S.P.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. **Cancer Research**, Chicago, v.60, n.16, p.4519-4525, 2000.

GALENKO-YAROSHEVSKII, A.P.; DERLUGOV, L.P.; PONOMAREV, V.V.; DUKHANIN A.S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new local anesthetic agent. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Nova Iorque, v.136, n.2, p.170-173, 2003.

GARCÍA-AYLLO, M.S.; SÁEZ-VALERO, J.; MUÑOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C.J. Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. **Neuroscience**, Oxford, v.107, n.2, p.199-208, 2001.

GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K.; RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. **Journal of Medical Genetics**, Londres, v.13, p.38-42, 1976.

GATLEY, S.J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, Nova Iorque, v.41, n.8, p.1249-1254, 1991.

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, I.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromossomo 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, San Diego, v.11, n.2, p.455-458, 1991.

GEORGE, S.T.; BALASUBRAMANIAN, A.S. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v.121, n.1, p.177-186, 1981.

GETMAN, D.K.; EUBANKS, J.H.; CAMP, S.; EVANS, G.A.; TAYLOR, P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.51, n.1, p.170-177, 1992.

GINZINGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v.30, n.6, p.503-512, 2002.

GIRARD, E.; BERNARD, V.; MINIC, J.; CHATONNET, A.; KREJCI, E.; MOLGÓ J. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. **Life Sciences**, Oxford, v.80, n.24-25, p.2380–2385, 2007.

GNATT, A.; PRODY, C.A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous system tumors. **Cancer Research**, Chicago, v.50, n.7, p.1983-1987, 1990.

GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE JR., C.W. Pseudochoolinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. **Nature**, Londres, v.299, n.5882, p.439-442, 1982.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v.264, n.3, p.672-686, 1999.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S.A., 1988.

HADA, T.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; NAKAOKA, H.; HIROSAKI, A.; FUJIKURA, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. Alteration of serum cholinesterase isozyme in patients with liver cirrhosis. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdã, v.178, n.1, p.111-112, 1988.

HIBI, K.; TRINK, B.; PATTURAJAN, M.; WESTRA, W.H.; CABALLERO, O.L.; HILL, D.E.; RATOVIJSKI, E.A.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, n.10, p.5462-5467, 2000.

HODGSON, S.V.; EVANS, G. The inherited basis of cancer, In: HODGSON, S.V. **Inherited Susceptibility to Cancer: Clinical, predictive and ethical perspectives**. P.8, 1998.

HORSMAN, D.E.; GASCOYNE, R.D.; BARNETT, M.J. Acute leukemia with structural rearrangements of chromosome 3. **Leukemia and Lymphoma**, Nova Iorque, v.16, pp.369-377, 1995.

HUNT, K.K.; ROBB, G.L.; STROM, E.A.; UENO, N.T. Breast Cancer. The MD Anderson Cancer Care Series, p.56, 2001. Disponível em : <<http://books.google.com/books>> Acesso em Dezembro de 2007.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer e Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>> Acesso em Dezembro de 2007.

JBILLO, O.; BARTELS, C.F.; CHATONNET, A.; TOUTANT, J.P.; LOCKRIDGE, O. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. **Toxicol**, Nova Iorque, v.32, n.11, p.1445-1457, 1994.

JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, Londres, v.2, n.5, p.234-40, 1992.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v.18, p.781-790, 2000.

JUNG, V.; KINDICH, R.; KAMRADT, J.; JUNG, M.; MÜLLER, M.; SCHULZ, W.A.; ENGERS, R.; UNTEREGGER, G.; STÖCKLE, M.; ZIMMERMANN, R.; WULLICH, B. Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals *TLOC1/SEC62* as a probable target gene in prostate cancer. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v.4, n.3, p.169-176, 2006.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.; PIPER, J.; TANNER, M.; STOKKE, T.; CHEN, L.; SMITH, H.S.; PINKEL, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN, F.M. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p. 2156-2160, 1994.

KALOW, W.; DAVIES, R.O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, Nova Iorque, v.1, p.183-192, 1958.

KANIARIS, P.; FASSOULAKI, A.; LIARMAKOPOULOU K.; DERMITZAKIS, E. Serum cholinesterase levels in patients with cancer. **Anesthesia & Analgesia**, Cleveland, v.58, n.2, p.82-84, 1979.

KAWATO, Y.; SEKIGUCHI, M.; AKAHANE, K.; TSUTOMI, Y.; HIROTA, Y.; KUGA, H.; SUZUKI, W.; HAKUSUI, H.; SATO, K. Inhibitory activity of camptothecin derivatives against acetylcholinesterase in dogs and their binding activity to acetylcholine receptors in rats. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v.45, n.5, p.444-448, 1993.

KÖNIGSHOFF, M.; WILHELM, J.; BOHLE, R.M.; PINGOUD, A.; HAHN, M. *HER-2/neu* gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.49, n.2, p.219-229, 2003.

KVITKO, K. A Carcinogênese e seus Agentes In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

KUTTY, K.M.; PAYNE, R.H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Nova Iorque, v.8, n.4, p.247-50, 1994.

LA DU, B.N.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; ARPAGAUS, M.; LOCKRIDGE, O. Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Nova Iorque, v.11, n.1, p.79-89, 1991.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n.12, p.4715-4719, 1989.

LARGENT, J.A.; ZIOGAS, A.; ANTON-CULVER, H. Effect of reproductive factors on stage, grade and hormone receptor status in early-onset breast cancer. **Breast Cancer Research**, Londres, v.7, n.4, p.541-554, 2005.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, Londres, v.6, n.62, 2005.

LAYER, P.G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Nova Iorque, v.11, n.1, p.7-33, 1991.

LAYER, P.G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, Oxford, v.28, n.5-6, p.491-495, 1996.

LAYER, P.G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.84, n.1, p.284-288, 1987.

LAYER, PG; WILLBOLD, E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Stuttgart, v.29, n.3, p.1-94, 1995.

LI, B.; STRIBLEY, J.A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L.M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, Londres, v.75, p.1320-1331, 2000.

LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A 'silent' pseudocholinesterase gene. **Nature**, Londres, v.193, p.561-562, 1962.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.262, n.2, p.549-557, 1987.

LOCKRIDGE, O.; MOTTERSHAW-JACKSON, N.; ECKERSON H.; LA DU, B.N. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.215, n.1, p.1-8, 1980.

LOISELET, J.; SABBAGH, W; SROUJI, G. Cholinestérase sérique et acétylcholinesterase globulaire dans 89 cas de cancer. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v.26, n.5-6, p.659-664, 1968.

LU, Y.J.; BIRDSALL, S.; OSIN, P.; GUSTERSON, B.; SHIPLEY, J. Phyllodes tumors of the breast analyzed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. **Genes Chromosomes Cancer**, Nova lorque, v.20, n.3, p.275-281, 1997.

MAIN, A.R.; SOUCIE, W.G.; BUXTON, I.L.; ARINC, E. The purification of cholinesterase from horse serum. **The Biochemical Journal**, Londres, v.143, n.3, p.733-744, 1974.

MARTÍNEZ-MORENO, P.; NIETO-CERON, S.; RUIZ-ESPEJO, F.; TORRES-LANZAS, J.; TOVAR-ZAPATA, I.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, P.; VIDAL, C.J.; CABEZAS-HERRERA, J. Acetylcholinesterase biogenesis is impaired in lung cancer tissues. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdã, v.15, n.157-158, p.359-361, 2005.

MARTÍNEZ-MORENO, P.; NIETO-CERÓN, S.; TORRES-LANZAS, J.; RUIZ-ESPEJO, F.; TOVAR-ZAPATA, I.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N.; VIDAL, C.J.; CABEZAS-HERRERA, J. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. **Carcinogenesis**, Nova lorque, v.27, n.3, p.429-436, 2006.

MARSH, D.J.; THEODOSOPOULOS, G.; MARTIN-SCHULTE, K.; RICHARDSON, A.L.; PHILIPS, J.; RÖHER, H.D.; DELBRIDGE, L.; ROBINSON, B.G. Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v.88, n.4, p.1866-1872, 2003.

MARX, J. Learning how to suppress cancer. **Science**, Washington, v.261, p.1385-1387, 1993.

MASSON, P.; FROMENT, M.T.; FORTIER, P.L.; VISICCHIO, J.E.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1387, n.1-2, p.41-52, 1998.

MAULET, Y.; CAMP, S.; GIBNEY, G.; RACHINSKY, T.L.; EKSTRÖM, T.J.; TAYLOR, P. Single gene encodes glycopospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: alternative coding exons contain inverted repeat sequences. **Neuron**, Cambridge, v.4, n.2, p.289-301, 1990.

MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n. 3, p.953-957, 1989.

MCILROY, S.P.; CRAWFORD, V.L.S.; DYNAN, K.B.; MCGLEENON, B.M.; VAHIDASSRM, D.; LAWSON, J.T.; PASSMORE, A.P. Butyrylcholinesterase K

variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. **Journal of Medical Genetics**, Londres, v.37, p.182-185, 2000.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, Oxford, v.110, n.4, p.627-639, 2002.

MEYER, J.S.; FAHRNER, M.; DANIEL, F.C. Pathology and behavior of small breast carcinomas. **Seminars in Diagnostic Pathology**, Philadelphia v.16, n.3, p.257-268, 1999.

MIKAMI, L.R.; WIESELER, S.; SOUZA, R.L.R.S.; SCHOPFER, L.M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v.18, n.3, p.213-218, 2008.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v.189, n.3, p.1280-1286, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE / SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/BR/Brasil_GeralBR.xls> Acesso em Janeiro de 2008.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran – Fundamentos de patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2006.

MYLLYKANGAS, S.; KNUUTILA, S. Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. **Cancer Letters**, Amsterdã, v.232, p.79-89, 2006.

MONTENEGRO, M.F.; NIETO-CERON, S.; RUIZ-ESPEJO, F.; PAEZ DE LA CADENA, M.; RODRIGUEZ-BERROCAL, F.J.; VIDAL, C.J. Cholinesterase activity and enzyme components in healthy and cancerous human colorectal sections. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdã, v.15, n.157-158, p.429-430, 2005.

NACHON, F.; NICOLET, Y.; VIGUIE, N.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C.; LOCKRIDGE, O. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v.269, p.630-637, 2002.

NANJUNDAN, M.; NAKAYAMA, Y.; CHENG, K.W.; LAHAD, J.; LIU, J.; LU, K.; KUO, W.L.; SMITH-MCCUNE, K.; FISHMAN, D.; GRAY, J.W.; MILLS, G.B. Amplification of *MDS1/EVI1* and *EVI1*, located in the 3q26.2 amplicon, is associated with favorable patient prognosis in ovarian cancer. **Cancer Research**, Chicago, v.67, n. 7, p.3074-3084, 2007.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>> Acesso em Setembro de 2006.

NIKITINA, T.V.; NAZAROVA, N.I.; TISHCHENKO, L.I.; TUOHIMAA, P.; SEDOVA, V.M. Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431. **Tsitologiya**, Moskva, v.45, n.4, p.392-402, 2003.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia & Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

O'DRISCOLL, L.; CLYNES, M. Molecular markers of multiple drug resistance in breast cancer. **Chemotherapy**, Nova Iorque, v.52, n.3, p.125-129, 2006.

OLIVEIRA, A.M.; ROSS, J.S.; FLETCHER, J.A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.124, Suppl:S16-28, 2005.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>> Acesso em Fevereiro de 2008.

ONGANER, P.U.; DJAMGOZ, M.B.; WHYTE, K.; GREENFIELD, S.A. An acetylcholinesterase-derived peptide inhibits endocytic membrane activity in a human metastatic breast cancer cell line. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v.1760, n.3, p.415-420, 2006.

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

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. **Acta Medica**, Hradec Králové, v.47, n.4, p.215-228, 2004.

PERRY, C.; SKLAN, E.H.; BIRIKH, K.; SHAPIRA, M.; TREJO, L.; ELDOR, A.; SOREQ, H. Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. **Oncogene**, Basingstoke, v.21, n.55, p.8428-8441, 2002.

PIERGA, J.Y.; REIS-FILHO, J.S.; CLEATOR, S.J.; DEXTER, T.; MACKAY, A.; SIMPSON, P.; FENWICK, K.; IRAVANI, M.; SALTER, J.; HILLS, M.; JONES, C.; ASHWORTH, A.; SMITH, I.E.; POWLES, T.; DOWSETT, M. Microarray-based comparative genomic hybridisation of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. **British Journal of Cancer**, Londres, v.96, p.341-351, 2007.

PINTO, A.E.; ROQUE, LL; RODRIGUES, R.; ANDRÉ S.; SOARES, J. Frequent 7q gains in flow cytometric multiploid/hypertetraploid breast carcinomas: a study of chromosome imbalances by comparative genomic hybridisation. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v.59, n.4, p.367-72, 2006.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.58, p.52–64, 1996.

PRODY, C.A.; DREYFUS, P.; ZAMIR, R.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n.2, p.690–694, 1989.

PUJANA, M.A.; HAN, J.J.; STARITA, L.M.; KRISTEN N STEVENS, K.N.; TEWARI, M.; AHN, J.S.; RENNERT, G.; MORENO, V.; KIRCHHOFF, T.; GOLD, B.; ASSMANN, V.; ELSHAMY, W.M.; RUAL, J.F.; LEVINE, D.; ROZEK, L.S.; GELMAN, R.S.; GUNSALUS, K.C.; GREENBERG, R.A.; SOBHIAN, B.; BERTIN, N.; VENKATESAN, K.; AYIVI-GUEDEHOUSOU, N.; SOLÉ, X.; HERNÁNDEZ, P.; LÁZARO, C.; NATHANSON, K.L.; WEBER, B.L.; CUSICK, M.E.; HILL, D.E.; OFFIT, K.; LIVINGSTON, D.M.; GRUBER, S.B.; PARVIN, J.D.; VIDAL, M. Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. **Nature Genetics**, Nova Iorque, v.39, p.1338-1349, 2007.

QUINN D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. **Chemical Reviews**, Washington, v.87, p.955-979, 1987.

RACHINSKY T. L.; CRENSHAW E. B.; TAYLOR P. Assignment of the gene for acetylcholinesterase to distal mouse chromosome 5. **Genomics**, San Diego, v.14, n.2, p.511-514, 1992.

RÁCZ, A.; BRASS, N.; HECKEL, D.; PAHL, S.; REMBERGER, K.; MEESE, E. Expression analysis of genes at 3q26-q27 involved in frequent amplification in squamous cell lung carcinoma. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.35, n.4, p.641-646, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4^aed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.110, 2001.

RAVEH, L.; GRUNWALD, J.; MARCUS, D.; PAPIER, Y.; COHEN, E.; ASHANI, Y. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.45, n.12, p.2465-2474, 1993.

ROBERTSON, G.S. Serum cholinesterase deficiency II: pregnancy. **British Journal of Anaesthesia**, Londres, v.38, n.5, p.361-369, 1966.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; VIDAL, C.J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v.72, n.1, p.11-22, 2002.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; MUÑOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C.J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v.80, n.1, p.105-114, 2003.

SAEZ-VALERO, J.; VIDAL, C.J. Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v.1317, n.3, p.210-218, 1996.

SAMUELS, Y.; WANG, Z.; BARDELLI, A.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; YAN, H.; GAZDAR, A.; POWELL, S.M.; RIGGINS, G.J.; WILLSON, J.K.; MARKOWITZ, S.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V.E. High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers. **Science**, Washington, v.304, n.5670, p.554, 2004.

SHAYESTEH, L.; LU, Y.; KUO, W.L.; BALDOCCHI, R.; GODFREY, T.; COLLINS, C.; PINKEL, D.; POWELL, B.; MILLS, G.B.; GRAY, J.W. *PIK3CA* is implicated as an oncogene in ovarian cancer. **Nature Genetics**, Nova Iorque, v.21, n.1, p.99-102, 1999.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C_T difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdã, v.84, p.901-910, 2006.

SCHIMKE, R.T.; BROWN, P.C.; KAUFMAN, R.J. Gene amplification and drug resistance in mammalian cells. **National Cancer Institute monograph**, Bethesda, v.60, p.79-86, 1982.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdã, v.46, n.1-2, p.69-81, 2000.

SCHÖNBORN, I.; NISCHAN, P.; EBELING K. Oral contraceptive use and the prognosis of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v.30, n.3, p.283-292, 1994.

SCHOSTAK, M.; KRAUSE, H.; MILLER, K.; SCHRADER, M.; WEIKERT, S.; CHRISTOPH, F.; KEMPKENSTEFFEN, C.; KOLLERMANN, J. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. **BMC Urology**, Londres, v.15; p. 6-7, 2006.

SCHWARZ, M.; GLICK, D.; LOEWENSTEIN, Y.; SOREQ, H. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.67, n.2, p.283-322, 1995.

SIDELL, F.R.; KAMINSKIS, A. Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.21, n.10, p.1393-1395, 1975.

SIMON, N.M.; DEL GRECO, F.; DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M. Serum cholinesterase deficiency in renal failure. **Transactions - American Society for Artificial Internal Organs**, Los Angeles, v.15, p.328-332, 1969.

SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *ERBB2-2/neu* oncogene. **Science**, Washington, v.235, n.4785, p.177-82, 1987.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, Oxford, v.28, n.5-6, p.453-483, 1996.

SONG, P.; SEKHON, H.S.; JIA, Y.; KELLER, J.A.; BLUSZTAJN, J.K.; MARK, G.P.; SPINDEL, E.R. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. **Cancer Research**, Chicago, v.63, n.1, p.214-221, 2003.

SOREQ, H.; ZAKUT, H. Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: putative relationship to organophosphorous poisoning. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v.7, n.1, p.1-7, 1990.

SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y.; ZAKUT, H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, Nova Iorque, v.3, n.12, p.511-516, 1991.

SOREQ, H.; PATINKIN, D.; LEV-LEHMAN, E.; GRIFMAN, M.; GINZBERG, D.; ECKSTEINT, F.; ZAKUTT, H.; Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p.7907-7911, 1994.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature Reviews. Neuroscience**, Londres, v.2, n.4, p.294-302, 2001.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.P.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. **Human Biology**, Detroit, v.70, n.5, p.965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v.84, p.349-353, 2005.

STEPHENSON, J.; CZEPULKOWSKI, B.; HIRST, W.; MUFTI, G.J. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). **Leukemia Research**, Oxford, v.20, n.3, p.235-241, 1996.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, Washington, v.253, n.5022, p.872-879, 1991.

TAKAI, S.; LONG, J.E.; YAMADA, K.; MIKI, T. Chromosomal localization of the human *ECT2* proto-oncogene to 3q26.1-q26.2 by somatic cell analysis and fluorescence in situ hybridization. **Genomics**, San Diego, v.27, n.1, p.220-222, 1995.

TONON, G.; WONG, K.; MAULIK, G.; BRENNAN, C.; FENG, B.; ZHANG, Y.; KHATRY, D.B.; PROTOPOPOV, A.; YOUŞ, M.J.; AGUIRRE, A.J.; MARTIN, E.S.; YANG, Z.; JI, H.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, n.27, p.9625-9630, 2005.

VANDEN-BEMPT, I.; DRIJKONINGEN, M.; DE WOLF-PEETERS, C. The complexity of genotypic alterations underlying ERBB2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v.19, n.6, p.552-557, 2007.

VIDAL, C.J. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdã, v.15, n.157-158, p.227-232, 2005.

WEIKERT, T.; EBERT, C.; RASCHED, I.; LAYER, P.G. Novel inactive and distinctively glycosylated forms of butyrylcholinesterase from chicken serum. **Journal of Neurochemistry**, Londres, v.63, n.1, p.318-325, 1994.

WREN, B.G. The origin of breast cancer. **Menopause**, Nova Iorque, v.14, n.6, p.1060-1068, 2007.

WRIGHT, C.I.; GEULA, C.; MESULAM, M.M. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. **Annals of Neurology**, Boston, v.34, n.3, p.373 – 384, 1993.

YOKOI, S.; YASUI, K.; IIZASA, T.; IMOTO, I.; FUJISAWA, A.; INAZAWA, J. *TERC* identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.9, n.13, p.4705–4713, 2003.

ZAGO, A.; PEREIRA, L.A.A.; BRAGA, A.L.F.; BOUSQUAT, A. Mortalidade por câncer de mama em mulheres na Baixada Santista, 1980 a 1999. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.39, n.4, p.641-645, 2005.

ZAKUT, H.; EHRLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SEIDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.86, n.3, p.900–908, 1990.

ZAKUT, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y.; BEERI, R.; BALLIN, A.; SOREQ, H. In vivo gene amplification in non-cancerous cells: cholinesterase genes and oncogenes amplify in thrombocytopenia associated with lupus erythematosus. **Mutation Research**, Amsterdã, v.276, n.3, p.275-284, 1992.

ZIMMERMAN, B.T. Understanding breast cancer genetics. University Press of Mississippi, p.3 e 6, 2004. Disponível em: <<http://books.google.com/books>> Acesso em Julho de 2006.

Apêndice

Dados clínico-histopatológicos das pacientes.

(continua)

Pacientes	Idade	Etnia	Idade Menarca	Idade Menopausa	Uso de Pílula Anticoncepcional	Metástase no Linfonodo	Grau do Tumor	Tamanho do Tumor (cm)	Nº Filhos
1	68	Euro	12	49	-	Presente	II	-	1
2	55	-	-	-	-	Presente	-	68	-
3	51	Euro	-	48	-	Presente	II	55	0
4	47	Euro	11	-	SIM (2 anos)	Ausente	III	50	3
5	62	Euro	12	54	NÃO	Ausente	II	25	3
6	63	Euro	15	57	SIM (6 meses)	Presente	II	50	3
7	55	Euro	-	50	-	Presente	II	60	1
8	53	Euro	13	48	SIM (2 anos)	Presente	II	-	2
9	-	-	-	-	-	-	II	-	-
10	68	Euro	12	40	NÃO	Presente	II	35	1
11	56	Afro	13	49	-	Presente	III	40	3
12	74	Euro	9	50	NÃO	-	II	23	0
13	-	-	-	-	-	-	II	-	-
14	50	Euro	15	50	-	Ausente	I	40	3
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	87	Euro	16	54	NÃO	Presente	II	83	2
19	52	Euro	13	51	SIM (8 anos)	Ausente	II	30	2
20	62	Euro	12	55	SIM (13 anos)	Ausente	II	30	4
21	73	Euro	13	54	NÃO	Presente	II	60	2
22	-	-	-	-	-	-	II	-	-
23	82	-	14	48	-	Presente	II	45	3
24	75	Euro	11	50	NÃO	Ausente	III	-	3
25	46	Euro	11	-	SIM (5 anos)	Presente	II	-	3
26	59	Euro	12	53	SIM (10 anos)	Presente	II/III	-	2
27	40	-	-	-	-	Ausente	III	32	-
28	30	-	-	-	-	-	-	30	-
29	71	-	-	-	-	-	II	60	-
30	52	Euro	14	48	NÃO	Presente	I	35	0

(continua)

Pacientes	Idade	Etnia	Idade Menarca	Idade Menopausa	Uso de Pílula Anticoncepcional	Metástase no Linfonodo	Grau do Tumor	Tamanho do Tumor (cm)	Nº Filhos
31	53	Euro	13	52	SIM (20 anos)	Ausente	I	18	3
32	55	Euro	11	48	SIM (4 meses)	-	II	50	4
33	63	-	13	55	-	Ausente	I	40	4
34	53	-	-	-	-	Presente	II	70	-
35	-	-	-	-	-	-	-	25	-
36	56	Euro	13	54	NÃO	Presente	II	20	3
37	43	-	-	-	-	Ausente	II	25	-
38	44	Euro	15	45	SIM (16 anos)	-	-	-	2
39	72	Euro	13	52	NÃO	Ausente	I	35	3
40	55	Euro	13	40	NÃO	-	II	-	2
41	40	Euro	14	-	NÃO	Presente	II	35	-
42	78	-	-	50	-	Ausente	II	14	2
43	30	Euro	15	-	NÃO	Ausente	II	25	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	56	-	11	52	-	Presente	II	40	1
46	51	-	13	51	-	Ausente	III	20	3
47	79	-	-	-	-	Ausente	III	28	3
48	-	-	-	-	-	Presente	-	40	-
49	49	-	-	-	-	Presente	II	25	-
50	33	Euro	-	-	-	Presente	-	50	-
51	75	Euro	14	50	NÃO	Ausente	III	27	8
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	39	-	11	-	NÃO	Ausente	II	40	0
54	-	-	-	-	-	-	II	-	-
55	-	-	-	-	-	-	II	-	-

Euro = Euro-descendente

Afro = Afro-descendente

(continua)

Pacientes	Idade 1ª Gravidez	Fuma	Receptores de Estrógenos	Receptores de Progesterona	ERRB2	Tipos Histológicos
1	-	SIM	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
2	-	-	-	-	-	Infiltração Cutânea p/ Ca mamário
3	-	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
4	25	NÃO	Ausente	Ausente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
5	20	NÃO	Ausente	Ausente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
6	31	NÃO	Presente	-	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor/ Intraductal
7	-	-	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Lobular Invasor
8	23	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
9	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasivo
10	35	NÃO	Presente	Ausente	-	Carcinoma Ductal Invasor / Lobular Invasor
11	-	-	Presente	Presente	Amplificado	Carcinoma Ductal / Intraductal
12	-	NÃO	Presente	Presente	Amplificado	Carcinoma Ductal Invasor
13	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
14	-	NÃO	Presente	-	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
15	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
16	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
17	-	-	-	-	-	Adenocarcinoma Ductal Invasor
18	20	-	-	-	-	Carcinoma Ductal
19	-	NÃO	Ausente	Ausente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
20	23	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Ca Ductal Invasor / Intraductal
21	25	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal
22	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
23	-	-	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
24	21	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
25	20	NÃO	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal
26	26	NÃO	Presente	Ausente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
27	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
28	-	-	-	-	-	Carcinoma Mastite Crônica
29	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
30	-	SIM	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor

(conclusão)

Pacientes	Idade 1ª Gravidez	Fuma	Receptores de Estrógenos	Receptores de Progesterona	ERRB2	Tipos Histológicos
31	20		Presente	Presente	-	Carcinoma Túbulo Lobular Infiltrante
32	25	NÃO	Presente	Presente	-	Carcinoma Lobular Infiltrante
33	-	-	-	-	-	Carcinoma Tubular Invasor
34	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
35	-	-	-	-	-	Carcinoma Medular
36	26	NÃO	Presente	Presente	-	Carcinoma Ductal Invasor
37		-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
38	21	-	-	-	-	Carcinoma Ductal
39	21	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Multicentrico
40	20		Ausente	Ausente	Amplificado	Carcinoma Ductal Infiltrante
41	-	-	Presente	Presente	Amplificado	Carcinoma Medular
42	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
43	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
44	-	-	-	-	-	Neoplasia maligna
45	-	-	Presente	Presente	Amplificado	Carcinoma Ductal Invasor
46	-	-	Presente	Presente	Amplificado	Carcinoma Ductal Invasor
47	-	-	Ausente	Ausente	Amplificado	Carcinoma Ductal Invasor
48	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
49	-	-	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
50	-	-	Presente	Presente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
51	20	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
52	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
53	-	-	Presente	Ausente	Inalterado	Carcinoma Ductal Invasor
54	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor
55	-	-	-	-	-	Carcinoma Lobular Invasor