

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCOS EUZÉBIO MACIEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BRCA1* E *FHIT* EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS**



CURITIBA

2011

MARCOS EUZÉBIO MACIEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BRCA1* E *FHIT* EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, Área de Concentração:
Genética.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de Souza
Fonseca Ribeiro**

Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2011

Dedico este trabalho para meus avós:

Artidor Alves Maciel (*in memoriam*) e Anita Moreira da Costa Maciel,
Alfredo Modena (*in memoriam*) e Carmelina Corleoni Modena,
pois sem a vontade inovadora destas pessoas simples
há cinco décadas atrás, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

“À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Enilze M. S. F. Ribeiro e ao meu co-orientador Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, que me auxiliaram de maneira brilhante na elaboração desta tese, bem como durante o longo período que tive a honra de permanecer no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética.”

“Ao Prof. Dr. Emerson Wander Silva Soares, Prof. Dr. Cícero Urban de Andrade, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodriguez de Souza, e à Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho, por terem aceitado fazer parte da Banca Avaliadora desta Dissertação.”

“À Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Petzl-Erler, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, por ter feito parte da comissão de acompanhamento desta tese.”

“À minha colega do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Bruna Mayumi Sugita, que participou da produção deste trabalho. Também a todos os colegas que tive ao longo de 10 anos de convívio neste laboratório, que me auxiliaram e tornaram prazeroso cada dia de trabalho.”

À Sarah pelo apoio e carinho em todos os momentos, sendo uma pessoa indispensável em minha vida.”

“Aos meus colegas do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), pelo auxílio nos momentos finais deste trabalho.”

“À todos os meus colegas de Pós-graduação, especialmente Márcio, Rodrigo e Gustavo, por serem simplesmente os melhores amigos que alguém pode ter.”

“À todas as pessoas pertencentes as instituições envolvidas nesta pesquisa, sobretudo ao Dr. Rubens Lima e Dr. Cícero Urban de Andrade, aos funcionários da Oncoclínica de Curitiba, do Hospital de Clínicas, Hospital Nossa Senhora das Graças, e à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Aos meus pais Napoleão Oswaldo Maciel e Adelina Modena Maciel e, meu irmão Sávio Alencar Maciel, que sempre doaram seu incentivo incondicional sendo uma referência segura de caráter, moral e determinação em minha vida.”

“A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram e, principalmente, à Deus, porque mesmo quando estamos sozinhos, lutando para entender a grandiosidade da vida, Ele está do nosso lado nos dando condições para viver cada dia plenamente.”

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

RESUMO

Em todo o mundo mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama por ano, e 410.000 vão a óbito em decorrência desta doença, representando 14% dos óbitos de mulheres por câncer. Análises de perda de heterozigose (LOH) em tumores mamários esporádicos têm indicado perdas alélicas frequentes nos locos 17q21 e 3p14, onde estão localizados os genes *BRCA1* e *FHIT*, respectivamente. A redução nos níveis de expressão destes genes também tem sido descrita, e está associada a parâmetros de pior prognóstico no câncer de mama. Embora algumas interações dos produtos destes genes sejam conhecidas, são necessários mais estudos que avaliem a relação entre essas interações nos níveis genômico e de expressão. Com o objetivo de caracterizar a expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* e sua relação com a presença ou ausência de LOH, parâmetros histopatológicos e de evolução clínica, foram avaliadas 47 pacientes portadoras de tumores mamários esporádicos com perfil de LOH estabelecido. As médias da expressão gênica relativa foram determinadas através de qRT-PCR utilizando o método do Cq comparativo. O gene *FHIT* apresentou média de expressão ($0,0299 \pm 0,0377$, $n = 44$) aproximadamente três vezes maior do que a do gene *BRCA1* ($0,0099 \pm 0,0054$, $n=35$) ($t = 3,428 > t_c = 2,027$). As médias de expressão dos genes apresentaram correlação significativa ($r=0,65$; $p<0,0001$). As comparações entre as médias de expressão de *BRCA1* e *FHIT* e os grupos de presença ou ausência de LOH não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. De maneira geral, as comparações entre as médias de expressão dos genes e os parâmetros histopatológicos e de evolução clínica não apresentaram diferenças significativas, exceto para o grupo de presença de linfonodos metastáticos, que apresentou média de expressão do *BRCA1* menor em relação ao grupo de ausência ($t' = 2,33 > t_c = 2,13$). Estes dados sugerem uma relação entre os genes que, conforme descrito na literatura, desempenham uma função importante nos processos de gênese e progressão tumoral. Devido as suas conhecidas atuações na regulação do reparo de danos no DNA e no controle da apoptose, alterações na expressão destes genes têm implicações nos parâmetros de pior prognóstico nos cânceres mamários. A regulação dos promotores através de metilação e/ou da ligação de fatores de transcrição e a possível contaminação das amostras com células não tumorais adjacentes podem explicar a ausência de correspondência entre LOH e a expressão gênica.

Palavras-chave: Expressão gênica. Genes supressores tumorais. Perda de heterozigose.

ABSTRACT

Worldwide over one million of women are diagnosed with breast cancer each year and 410,000 will die due to this disease. This represents 14% of female deaths from cancer. Analysis of loss of heterozygosity (LOH) in sporadic breast tumors have shown frequent allelic losses at loci 17q21 and 3p14, where the *BRCA1* and *FHIT* genes are located, respectively. Lower levels of protein expression of these genes have also been described, in association with poor prognosis parameters in these tumors. Although some interactions of the products of these genes are known, further studies are necessary to assess the correlation among these interactions at the genomic, mRNA and protein levels. To characterize the mRNA expression of *BRCA1* and *FHIT* and their correlation with the presence or absence of LOH, histopathological parameters and clinical outcome, we evaluated 47 sporadic breast cancer patients with an established LOH profile. The relative gene expression was determined by qRT-PCR using the Cq comparative method. The gene expression levels of both genes were significantly correlated ($r=0.65$, $p<0.0001$; *FHIT* - $0,0299+0,0377$, $n = 44$; *BRCA1* - $0,0099+0,0054$, $n=35$). However, the comparisons of their expression with the presence or absence of LOH was not statistically significant. The comparisons of gene expression with the histopathological parameters and clinical outcome were also not significantly different, except for the group of patients with lymph node metastasis, which presented lower expression levels of *BRCA1* in comparison to the patients from the lymph node negative group ($t'=2.33 > t_c=2.13$). These data suggest a correlation among the genes and support the important role that they play in the processes of genesis and tumor progression. Due to their function in the regulation of DNA damage repair and cell death, changes in their expression directly affect breast cancer prognosis. The regulation of the promoter of the genes by methylation and/or binding of transcription factors, and the possible contamination of samples with adjacent non-tumor cells, may explain the absence of correlation between LOH and gene expression.

Key words: Gene expression. Tumor suppressor genes. Loss of heterozygosity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ATUAÇÃO DA BRCA1 NOS PROCESSOS DO CICLO CELULAR.....	19
FIGURA 2 – ATUAÇÃO DA BRCA1 NOS PONTOS DE CHECAGEM DO CICLO CELULAR.....	20
FIGURA 3 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS DA BRCA1 E SÍTIOS DE INTERAÇÕES PROTEICAS.....	23
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>FHIT</i> E REPRESENTAÇÃO DOS EXONS.....	25
FIGURA 5 – EXPRESSÃO DE <i>FHIT</i> NOS TUMORES HUMANOS FREQUENTES.....	26
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS NAS PACIENTES ANALISADAS.....	33
FIGURA 7 – GRÁFICO Δ RN (VARIAÇÃO NO SINAL FLUORESCENTE) X NÚMERO DE CICLOS MOSTRANDO UMA CURVA DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDA EM UMA REAÇÃO DE qPCR EM TEMPO REAL PARA O GENE <i>FHIT</i> COM SUAS 3 FASES CARACTERÍSTICAS.....	42
FIGURA 8 – GRÁFICO GERADO PELO SOFTWARE DataAssist® PARA ESTABILIDADE DOS GENES CANDIDATOS <i>GAPDH</i> , <i>CICLOFILINA</i> e β - <i>ACTINA</i>	44
FIGURA 9 – CURVA PADRÃO DO GENE <i>FHIT</i> COM CINCO DILUIÇÕES SERIADAS.....	48
FIGURA 10 – EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i>	53
FIGURA 11 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON ($r = 0,65$)	54
FIGURA 12 – VALORES DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA (RQ) DE <i>BRCA1</i>	58
FIGURA 13 – VALORES DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA (RQ) DE <i>FHIT</i>	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	CARACTERÍSTICAS DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES UTILIZADOS E INICIADORES.....	36
QUADRO 2 –	COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE PCR.....	36
QUADRO 3 –	COMPOSIÇÃO DE REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO.....	39
QUADRO 4 –	CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO PARA O TERMOCICLADOR EPPENDORF MASTERCYCLER.....	40
QUADRO 5 –	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES DE qRT-PCR.....	45
QUADRO 6 –	COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE qRT-PCR.....	46
QUADRO 7 –	CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO DE qRT-PCR.....	46
QUADRO 8 –	INFORMAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA PACIENTE.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	INFORMAÇÕES CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO.....	32
TABELA 2 –	DADOS DE <i>slope</i> , INTERCESSÃO COM EIXO Y, EFICIÊNCIA DE REAÇÃO E R^2 , PARA AS CURVAS PADRÃO CONSTRUIDAS PARA VALIDAÇÃO DE EXPERIMENTOS COM OS GENES β -ACTINA, CICLOFILINA, BRCA1 E FHIT.....	48
TABELA 3 –	VALORES DE R^2 PARA VALIDAÇÃO DAS REAÇÕES DE qRT-PCR PARA OS GENES DE REFERÊNCIA E GENES ALVOS.....	49
TABELA 4 –	VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E DO TESTE <i>t</i> OBTIDOS NAS COMPARAÇÕES ENTRE CLASSES COM LOH OU ROH CONCOMITANTE E ISOLADA PARA OS GENES BRCA1 E FHIT.....	54
TABELA 5 –	CLASSE DE REFERÊNCIA, VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E TESTE <i>t</i> PARA O GENE BRCA1 NAS COMPARAÇÕES NOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	56
TABELA 6 –	CLASSE DE REFERÊNCIA, VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E TESTE <i>t</i> PARA O GENE FHIT NAS COMPARAÇÕES NOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 GENÉTICA DAS NEOPLASIAS.....	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS TUMORES MAMÁRIOS.....	14
1.3 NEOPLASIAS MAMÁRIAS E MARCADORES GENÉTICOS.....	18
1.3.1 Alterações Genéticas e Expressão de <i>BRCA1</i>	21
1.3.2 Alterações Genéticas e Expressão de <i>FHIT</i>	24
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	31
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DE TECIDO TUMORAL.....	34
4.3 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSIDADE.....	34
4.3.1 Extração e Amplificação do DNA de Sangue Periférico e Tumoral.....	34
4.3.2 Análise de LOH.....	37
4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	38
4.4.1 Extração de RNA.....	38
4.4.2 Reação de Retrotranscrição.....	39
4.4.3 PCR em Tempo Real Quantitativa (qRT-PCR).....	40
4.4.4 Quantificação Relativa.....	42
4.4.5 Determinação dos Genes de Referência.....	43
4.4.6 Oligonucleotídeos Iniciadores e Reação de qRT-PCR.....	44
4.4.7 Validação da qRT-PCR pelo Método da Curva Padrão.....	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS	50
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENÉTICA DAS NEOPLASIAS

As primeiras observações relevantes no estudo das neoplasias datam de 1890, quando o patologista alemão David Hansemann (1890, citado por Mitelman, 2000) observou irregularidades nucleares e mitóticas estudando biópsias de carcinomas, seguido de Theodor Boveri (1914, citado por Mitelman, 2000) que em 1914, postulou que aberrações cromossômicas seriam responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas. Entretanto, somente na década de 60, os estudos citogenéticos das células neoplásicas permitiram que a hipótese de Boveri pudesse ser confirmada, com a descrição da primeira alteração citogenética associada a uma neoplasia, o cromossomo Philadelphia (Ph¹) descrito na Leucemia Mieloide Crônica (NOWELL; HUNGERFORD, 1960).

A partir da década de 70, com o desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico (ZECH, 1969; CASPERSSON; ZECH; JOHANSSON, 1970a, 1970b, 1970c, 1970d), os estudos citogenéticos em neoplasias apresentaram um grande avanço contribuindo de forma importante para o esclarecimento das alterações cromossômicas envolvidas e para a formulação de novos conceitos sobre a etiologia genética das neoplasias. Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas em biologia molecular permitiu a clonagem e a identificação de genes localizados nos pontos de quebra das alterações cromossômicas, possibilitando uma nova compreensão sobre a etiologia da doença, com importantes informações sobre o papel dos principais grupos gênicos estudados em neoplasias, os oncogenes e genes supressores.

Os produtos de oncogenes e genes supressores de tumor estão envolvidos no controle do ciclo celular, que é dividido em quatro fases: na fase G1 ocorre todo o processo de produção de fatores envolvidos na fase seguinte, a fase de replicação do DNA; na fase S, ou de síntese, ocorre a replicação do material genético; na fase G2 ocorre a produção dos componentes necessários para a segregação

HANSEMANN, D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. **Virchows Arch. Anat.**, v. 119, p. 299-326, 1890.

BOVERI, T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Gustav Fisher, **Jena**, 1914.

cromossômica e divisão celular; e na fase M ocorre o processo de divisão da célula. Todas essas fases são coordenadas por complexas interações entre vários fatores proteicos que garantem a integridade do DNA e da célula ao passar de uma fase para outra, os chamados pontos de checagem. Muitos proto-oncogenes e genes supressores de tumor têm seus produtos atuando nesses pontos durante o ciclo celular, e alterações nesses genes podem gerar um descontrole do ciclo contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Os oncogenes são capazes de introduzir ou manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas apropriadamente selecionadas. Representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares funcionais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular (BISHOP, 1985; GORDON, 1985; WEINBERG, 1985; BISHOP, 1987). A ativação dos oncogenes celulares pode-se dar por alterações reguladoras, estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994). Além dos oncogenes, os genes supressores de tumor são de grande importância para o estudo do câncer. Alterações que inativem estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos nos pontos de checagem do ciclo celular, levando à proliferação desordenada, característica da célula neoplásica (WEINBERG, 1991). A relação entre genes supressores de tumor e o câncer foi primeiramente proposta na década de 70, quando Knudson elaborou a “Hipótese dos Dois Eventos” para explicar a ocorrência esporádica e familiar do retinoblastoma, um raro câncer intra-ocular da infância (KNUDSON, 1971; NUSSBAUM *et al.*, 2001).

Através do estudo de polimorfismos de DNA na região próxima ao gene *RB1*, foi observado que indivíduos com retinoblastoma, heterozigotos nos tecidos normais, tinham tumores com apenas um dos alelos, revelando uma perda de heterozigose (*loss of heterozygosity* - LOH) na região do gene *RB1* (13q). Nos casos familiares, o alelo mutado era herdado. Portanto, a LOH geralmente representa a perda do alelo selvagem em heterozigotos. Pode ocorrer por deleção intersticial, recombinação mitótica ou não disjunção dos cromossomos durante a divisão celular. O mecanismo descrito para o retinoblastoma é comum a outros genes supressores de tumor, e este modelo pode ser aplicado a outros tipos de cânceres familiares, como o câncer de mama familiar. A LOH também é observada em vários outros

tumores, esporádicos ou familiares, e é considerada uma evidência da existência de genes supressores de tumor, mesmo que ainda desconhecidos (NUSSBAUM *et al.*, 2001).

Além de genes envolvidos no controle do ciclo celular, verifica-se que processos ligados à senescência também são causadores de instabilidade genômica. Sabe-se que a incidência de câncer em seres humanos aumenta exponencialmente com a idade, referendando a sugestão de que múltiplas alterações genéticas são necessárias para a tumorigênese (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993). Desse modo, as principais alterações genéticas observadas nas neoplasias incluem a expressão aumentada ou ativação mutacional de proto-oncogenes (FEARON; VOGELSTEIN, 1990), inativação de genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991), alterações nos genes de reparo de danos no DNA (HOEIJMAKERS, 2001), instabilidades cromossômicas (LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998), reativação da telomerase (GREIDER; BLACKBURN, 1995) e alterações epigenéticas (ROUNTREE *et al.*, 2001).

Considerando-se que a suscetibilidade de uma determinada célula sofrer transformação está diretamente relacionada à sua capacidade em metabolizar carcinógenos (endógenos e exógenos) e em reparar o seu DNA, um sistema de reparo eficiente é fundamental na manutenção da integridade do genoma, pois evita o acúmulo de lesões no DNA (AUTRUP, 2000).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS TUMORES MAMÁRIOS

A Organização Mundial da Saúde estimou 84 milhões de mortes por câncer no mundo para a próxima década. Dados de saúde pública indicam importante crescimento nos parâmetros de incidência, mortalidade e custos de tratamento para o câncer de mama. Em todo o mundo, mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama por ano e aproximadamente 410 mil vão a óbito em decorrência desta doença, representando 14% dos óbitos de mulheres por câncer (COUGHLIN; EKWUEME, 2009).

Jemal *et al.* (2010), estimaram para o ano de 2010, 1,5 milhões de novos casos de câncer nos Estados Unidos, e 569.490 mortes. Os três tipos de câncer

mais comuns entre as mulheres foram os da mama, pulmão/brônquios e cólon/reto, correspondendo a 52% de todos os casos, sendo o câncer de mama responsável por 28% (207.090) dos novos casos de câncer entre as mulheres.

Segundo dado recente do Instituto Nacional do Câncer, para o ano de 2010 é esperada no Brasil uma incidência de 49.240 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2010).

O câncer de mama é um grupo de doenças multifatoriais heterogêneas de etiologia complexa que apresenta proliferação descontrolada de células epiteliais/estromais e metástase. As primeiras lesões visíveis são as hiperplasias, caracterizadas por células epiteliais com alterações estruturais, sem atipia citológica e com poucas alterações genéticas (INCA, 2008).

O principal sinal do câncer de mama é o nódulo palpável ou tumor, acompanhado ou não de dor mamária. Podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações ou um aspecto semelhante à casca de uma laranja e podem também surgir nódulos palpáveis na axila (INCA, 2008). As formas mais eficazes para detecção precoce do câncer de mama são o exame clínico da mama e a mamografia. Devido aos procedimentos diagnósticos, assim como à melhoria da informação nos atestados de óbitos, observou-se um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama entre mulheres, de 1979 a 2000, passando de 5,77 a 9,74 óbitos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2008).

Uma variação regional na incidência e mortalidade de câncer de mama é verificada no Brasil, onde as áreas mais desenvolvidas apresentam as maiores taxas. Isto sugere que o ambiente e/ou estilo de vida podem estar influenciando na incidência desta doença (INCA, 2008). Por outro lado, este fato pode apenas estar refletindo a presença de melhores condições de diagnóstico e de registro nestas regiões. Procedimentos de triagem, melhorias no manejo local, quando em estágio inicial e, principalmente, a utilização de terapias adjuvantes sistêmicas, tem contribuído para a redução na mortalidade por câncer de mama nas últimas décadas (BERRY *et al.*, 2005).

Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico bom, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágios avançados (estádio III e IV). Investimentos tecnológicos e em recursos humanos no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce desta

neoplasia (mamografia), e a implementação de uma política nacional de informações sobre a prevenção da doença (por exemplo: orientações sobre o auto-exame das mamas), constituem estratégias importantes no sentido de reverter este cenário (INCA, 2010).

As causas do câncer de mama são ainda desconhecidas. Porém, existem alguns fatores de risco relacionados à susceptibilidade. A história familiar constitui um fator importante (o risco é maior de duas a três vezes), principalmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã e se desenvolveu antes da menopausa. Outro fator é a exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade. Os diferentes valores de incidência no mundo são consequência de diferentes exposições ambientais e estilo de vida, comprovados em estudos de migração. Entre os fatores ambientais, a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), presentes principalmente na fumaça do cigarro, parece ser o mais importante (VAURY *et al.*, 1995). Outros fatores que, embora controversos, parecem aumentar o risco são a ingestão de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool (PARKIN; BRAY; DEVESA, 2001). A presença de doença proliferativa benigna da mama apresenta um risco relativo aumentado, assim como as hiperplasias atípicas têm um risco maior que as típicas (INCA, 2010).

Dados de Jemal *et al.* (2011), indicam uma incidência de câncer de mama elevada em países da região Norte e Ocidental da Europa, Austrália/Nova Zelândia e América do Norte; intermediária em países da América do Sul, Caribe e Sul da África; e baixa na África Sub-Saariana e Ásia. Entre os fatores que contribuem para esta variação internacional estão as diferenças entre comportamento reprodutivo e hormonal, e a disponibilidade de serviços de diagnóstico precoce. Entre os fatores reprodutivos que contribuem para aumento do risco estão histórico menstrual prolongado, nuliparidade, uso de terapia hormonal pós-menopausa ou contraceptivos orais, e idade avançada da primeira gravidez. O consumo de álcool também aumenta o risco ao câncer de mama.

Os fatores de risco reprodutivos e hormonais aumentam a ocorrência de câncer de mama em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média), nuliparidade e idade da primeira gestação acima de 30 anos. O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvos de controvérsias.

Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN; BRAY; DEVESA, 2001). Collins, Blake e Crosignani (2005), em uma revisão sobre o risco de câncer de mama associado com o tratamento de reposição hormonal na menopausa, descreveram um risco maior em mulheres em tratamento do que em mulheres não tratadas ou que interromperam o tratamento. Para essas últimas, o risco diminui logo após o encerramento do tratamento atingindo os parâmetros normais de risco em cinco anos. Além disso, os autores indicam que o risco é maior em mulheres que utilizam o estrogênio juntamente com a progesterona no tratamento de reposição hormonal, do que em mulheres que utilizam somente estrogênio.

Um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama feminino está associado com uma prolongada exposição a níveis aumentados de estrogênio. Os dois principais tipos, 17β -estradiol e estrona (E2 e E1, respectivamente), são ligantes para o receptor de estrogênio e substratos para enzimas oxidativas, como a CYP1A1 (DAWLING *et al.*, 2004). Assim, um dos mecanismos de atuação do estrogênio (principalmente do E2) na carcinogênese mamária envolve um estímulo proliferativo das células epiteliais, que possibilita uma maior ocorrência de mutações espontâneas (YAGER, 2000). O potencial carcinogênico do estrogênio tem sido relacionado não somente à sua atividade mitótica, mas também ao papel dos estrogênios catecóis como metabólitos carcinógenos, que podem se ligar ao DNA desencadeando danos no mesmo (LIEHR, 2000). Além disso, ao serem metabolizados, os estrogênios catecóis produzem espécies de oxigênio reativas capazes de causar danos oxidativos ao DNA (LIEHR; ROY, 1990).

Os estudos epidemiológicos utilizando metodologias moleculares têm fornecido importantes informações para um melhor conhecimento sobre a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer, por meio da análise dos polimorfismos genéticos e das interações genético-ambientais. Os mesmos têm mostrado uma considerável variabilidade gênica interindividual com o potencial de definir subpopulações de mulheres com longo tempo de exposição aos promotores de crescimento celular, nas quais haveria uma maior probabilidade de ocorrência de eventos mutacionais. As informações resultantes desses estudos são potencialmente capazes de identificar alvos para a definição de estratégias, tanto

para a prevenção como para o procedimento terapêutico, com repercussões prognósticas (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

1.3 NEOPLASIAS MAMÁRIAS E MARCADORES GENÉTICOS

Através do acúmulo de alterações genéticas, células que passaram pelos estágios hiperplásicos e displásicos, podem tornar-se cânceres invasivos e metastáticos. Desde os estudos realizados por Vogelstein *et al.* (1988, citado por Garnis, Buys e Lam, 2004), que relacionaram mudanças histopatológicas com mutações em genes específicos em câncer colorretal, modelos de progressão têm sido desenvolvidos para muitos tipos de tumores, incluindo pulmão, mama, cabeça e pescoço e próstata. Análises mutacionais e de expressão gênica dos genes supressores de tumor e oncogenes no contexto inicial da tumorigênese podem fornecer informações sobre as funções desses genes na progressão do câncer (GARNIS; BUYS; LAM, 2004).

As alterações genéticas que permitem o surgimento de células neoplásicas ocorrem principalmente em vias de controle do ciclo celular e reparo de DNA. Admite-se que vários genes estão envolvidos nessas vias, muitos deles ainda não identificados, outros bem estabelecidos como componentes importantes e alguns estão sendo indicados como candidatos envolvidos na origem e progressão tumoral. Muitos estudos em cânceres de mama hereditários, ou seja, aqueles identificados em indivíduos de uma família na qual mutações específicas aumentam a suscetibilidade ao câncer; têm identificado genes de alto risco como *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* e *CDH1*; e de risco baixo ou moderado como os genes *CHEK2*, *TGFβ1*, *CASP8* e *ATM* (PALACIOS *et al.*, 2008).

O produto proteico do gene *BRCA1* (*breast cancer susceptibility gene 1*) é um importante componente nas vias de três processos principais do ciclo celular: reparo do DNA, pontos de checagem e apoptose (FIGURA 01). A via de reparo do DNA consiste em mecanismos independentes: (i) detecção da região do dano; (ii) ativação dos componentes celulares que atuam nos pontos de checagem no ciclo celular para possibilitar que a maquinaria celular repare o dano; e (iii) a capacidade

VOGELSTEIN, B.; FEARON, E. R.; HAMILTON, S. R.; KERN, S. E.; PREISINGER, A. C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A. M.; BOS, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N. Engl. J. Med.**, v. 319, p. 525-532, 1988.

para induzir/inibir a apoptose, caso o dano seja muito grave ou a célula tenha condições de continuar o ciclo. A proteína BRCA1 desempenha uma importante função na identificação de DNA danificado e também no reparo, através da sua interação com as moléculas de detecção de DNA danificado, como a ATM; e moléculas de reparo do DNA, como a RAD50, MRE11, NBS1 e BLM. Ainda, a BRCA1 pode interagir com componentes da via de reparo de reconhecimento de mau pareamento (*mismatch repair*) como as proteínas MLH1, MLH2 e MLH3 (MURRAY; MULLAN; HARKIN, 2007).

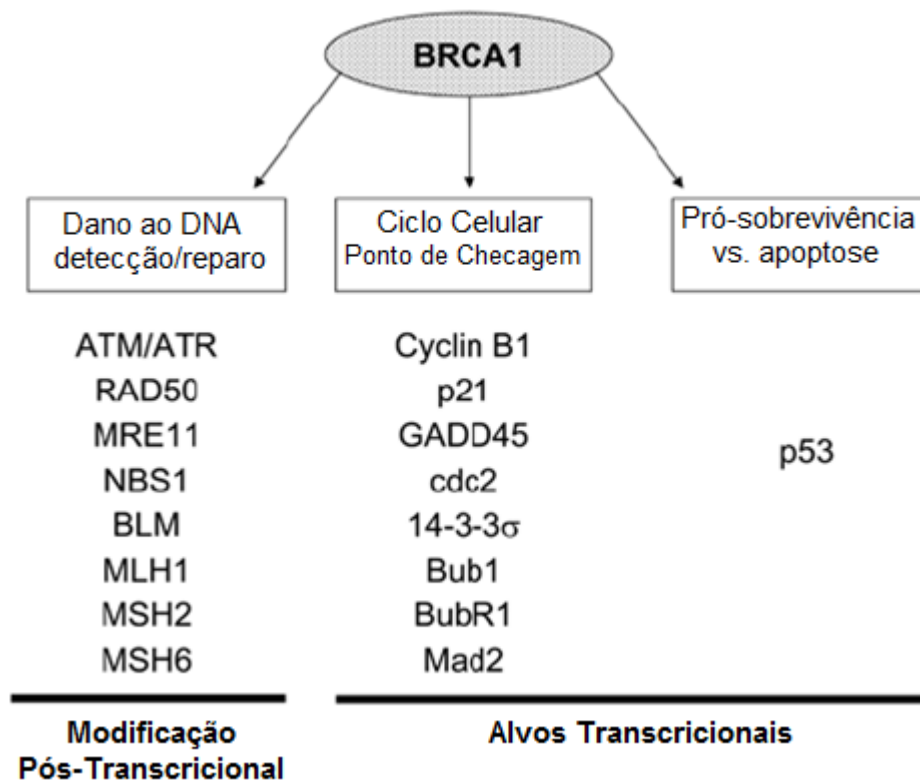


FIGURA 1 – ATUAÇÃO DA BRCA1 NOS PROCESSOS DO CICLO CELULAR

FONTE: MURRAY; MULLAN; HARKIN (2007), com modificações.

Na fase G1 do ciclo celular o complexo repressor HDAC liga-se à proteína RB (retinoblastoma) inibindo os fatores de transcrição E2F-DP1. A fosforilação da RB pelo complexo CDK (quinase dependente de ciclina) 4/6 -ciclina D, CDK2-ciclina A, CDK2-ciclina E, dissocia a RB do complexo repressor permitindo a transcrição dos genes da fase S. A proteína p21 atua como um inibidor do complexo CDK-

ciclina A/E, inibindo a passagem da fase G1 para a fase S (FIGURA 2). De acordo com um modelo apresentado por Murray, Mullan e Harkin (2007), a BRCA1 tem mostrado uma atividade de indução da transcrição da p21 independente da ação da proteína TP53, que também tem função reguladora do ciclo celular como supressora tumoral. Conseqüentemente a BRCA1 tem ação inibidora da passagem de G1 para S. Como mostrado na FIGURA 2, a BRCA1 também atua na regulação de outros dois pontos de checagem: da passagem de G2/M e na fase M. No ponto de checagem G2/M, a BRCA1 aumenta a expressão dos fatores inibidores de Cdc2, GADD45 e a proteína 14-3-3 σ . O complexo Cdc2-Ciclina B permite a passagem de G2 para M, o fator GADD45 e a proteína 14-3-3 σ inibem a formação deste complexo agindo sobre a Cdc2, realizando a parada em G2 para a checagem. Por fim, a BRCA1 atua na regulação do ponto de checagem M através da regulação da expressão dos fatores MAD2 e BubR1, que por sua vez controlam a expressão do complexo proteico APC (*anaphase promoting-complex*) e são importantes na sinalização para a formação do fuso mitótico durante a divisão celular. Na apoptose a BRCA1 interage e modula a atividade transcricional da proteína TP53. A BRCA1, quando não mutada, aumenta a resposta de promotores controlados pela TP53, incluindo a p21 e BAX (*Bcl-2 associated X protein*).

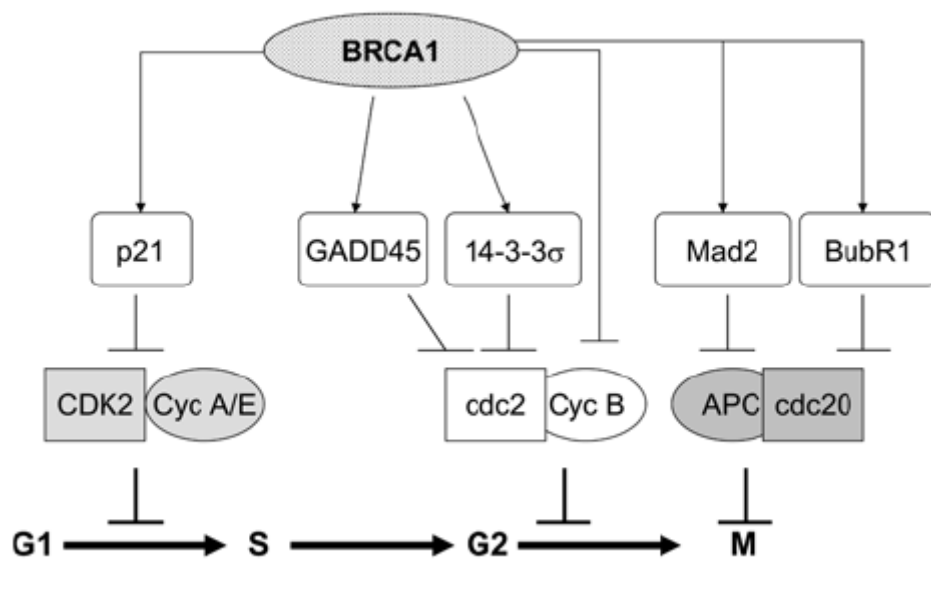


FIGURA 2 – ATUAÇÃO DA BRCA1 NOS PONTOS DE CHECAGEM DO CICLO CELULAR
 FONTE: MURRAY; MULLAN; HARKIN (2007).

Outra proteína associada com o controle do ciclo celular é a FHIT. Codificada pelo gene *FHIT* (*fragile histidine triad*), esta proteína controla a atividade do complexo Ap4A/Ap3A (diadenosina tetra e trifosfato), juntamente com a proteína TrpRS (triptofanil t-RNA sintetase). Altas concentrações do complexo Ap4A/Ap3A são necessárias para o funcionamento da proteína ApnA (diadenosina oligofosfato), que tem sido associado com várias funções relacionadas com o crescimento celular como indução de síntese de DNA, atividade mitogênica, transcrição gênica e regulação de canais de íons transmembrana (INGVARSSON, 2001).

Devido a funções importantes exercidas no ciclo celular pelos produtos dos genes *BRCA1* e *FHIT*, eles tornaram-se importantes candidatos para estudos de processos de origem das neoplasias e progressão tumoral.

1.3.1 Alterações Genéticas e Expressão de *BRCA1*

Análises de ligação genética em famílias com histórico de câncer de mama e ovário identificaram o primeiro gene de suscetibilidade ao câncer de mama no cromossomo 17q21.3 (HALL *et al.*, 1990). O gene *BRCA1*, posteriormente identificado por clonagem posicional (MIKI *et al.*, 1994), possui aproximadamente 100 kb e é formado por 5592 pares de bases com 24 exons (22 codificadores e 2 não-codificadores) que codificam uma proteína de 1863 aminoácidos. São conhecidos dez transcritos diferentes produzidos a partir do gene *BRCA1* por *splicing* alternativo. O mRNA completo do gene *BRCA1* possui 8,0 kb e transcritos menores com expressão tecido-específica com 7,0; 4,6 e 1,5-2,2 kb têm sido descritos (ROSEN *et al.*, 2003).

Posteriormente, análises das famílias com histórico de câncer de mama não ligado ao *BRCA1*, identificaram outro gene de suscetibilidade, o *BRCA2*, no cromossomo 13q12-13 (WOOSTER *et al.*, 1995).

De acordo com o modelo proposto por Knudson (1971), os genes *BRCA1* e *BRCA2* são considerados supressores de tumor clássicos por duas razões: primeiro, mutações na linhagem germinativa (primeiro evento pelo modelo de Knudson)

envolvendo esses genes estão associadas com predisposição ao câncer de mama precoce. Segundo, a LOH com perda do alelo selvagem (que pode ser o segundo evento) é frequentemente observada em tumores de mama esporádicos e familiares. Estes dois eventos levam à inativação da função e supressão tumoral e ao descontrole do crescimento celular (HOFMANN; SCHLAG, 2000).

Devido ao fato de muitas pacientes com câncer de mama hereditário apresentarem uma mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, a perda do alelo selvagem pode ser o evento genético somático, que ocorre nas glândulas mamárias dessas pacientes, dando início à progressão carcinogênica. Desse modo, estudos têm verificado a frequência de LOH através de marcadores microssatélites localizados em regiões próximas aos genes ou intragênicos, com o objetivo de corroborar a hipótese acima, ou ainda, encontrar novos genes candidatos a supressores de tumor em regiões investigadas previamente por outros métodos, como a citogenética clássica (CAVALLI *et al.*, 2004).

A fim de verificar a precocidade da LOH dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *FHIT*; Cavalli *et al.* (2004) avaliaram tumores de cinco pacientes com câncer de mama, quatro delas portadoras de mutação no *BRCA1* e uma no *BRCA2*. As amostras foram microdissectadas e células representativas de tecidos tumorais e normais foram analisadas (utilizando marcadores microssatélites) e apresentaram uma alta frequência de LOH (aproximadamente 50%). A alta frequência também nas células morfolologicamente normais sugere que a LOH destes genes é um evento inicial nos portadores de mutações em *BRCA1/2*.

Nos últimos 10 anos a expressão da proteína BRCA1 tem sido estudada através de indução de super expressão, de baixa expressão, de mutação de ponto ou deleção em modelos animais ou linhagens celulares. Estudos iniciais indicaram a presença de um domínio RING (faz a interação proteica e apresenta atividade E3 ubiquitina ligase, presente nos aminoácidos 20 a 64), e de um domínio de ativação de transcrição C-terminal (TAD, aminoácidos 1560-1863). Um segundo domínio de transativação denominado ADI (aminoácidos 1293-1560) pode independentemente ativar a transcrição ou sinergicamente estimular a transcrição junto com o domínio C-terminal TAD. Estes domínios necessitam da interação com diversos fatores que formam uma complexa rede de conexões entre as diversas vias em que a BRCA1 está envolvida durante os processos celulares (FIGURA 3) (ROSEN; FAN; MA, 2006).

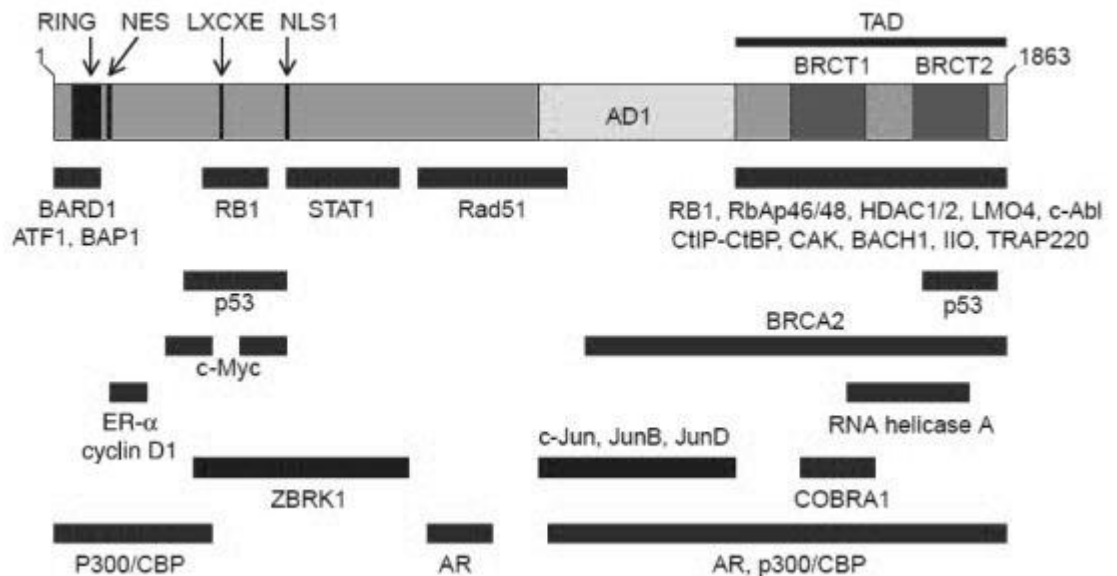


FIGURA 3 – ESTRUTURA DE DOMÍNIOS DA BRCA1 E SÍTIOS DE INTERAÇÕES PROTEICAS

FONTE: ROSEN; FAN; MA (2006).

NOTA: As barras abaixo do gene (barra maior) mostram as posições aproximadas de interação com a BRCA1.

A expressão do *BRCA1* é regulada em conjunto à do *BRCA2* em algumas situações. A expressão desses genes diminui quando as células são induzidas a tornarem-se quiescentes por confluência, falta de vascularização e por ação do fator de crescimento tumoral beta ($TGF-\beta$). Em linhagens celulares responsivas ao estrogênio (MCF-7 ou BT-20), a adição desse hormônio (17β -estradiol) causa um atraso na expressão do mRNA e proteínas BRCA1 e BRCA2, mostrando que o estrogênio é um importante regulador da atividade desses genes (RAJAN *et al.*, 1996). Entretanto, a proteína BRCA1 foi expressa independentemente do estímulo por estrogênio ou progesterona em populações de células em proliferação do ovário de camundongos e foi similarmente expressa em camundongos sem receptor de estrogênio, indicando que a regulação de *BRCA1* pelo estrogênio é indireta (ROSEN *et al.*, 2003).

Thompson *et al.* (1995) observaram a redução dos níveis de expressão de mRNA de *BRCA1* em tumores invasivos de mama quando comparados com tecido normal ou carcinomas ductais *in situ*. Esta informação foi confirmada pela

observação de que a diminuição dos níveis de BRCA1 está associada ao aumento da proliferação das células tumorais e que a expressão de BRCA1 induz a parada do crescimento e a apoptose.

Após este trabalho, vários estudos corroboraram esta correlação e estenderam a observação. Um desses trabalhos avaliou 142 tumores esporádicos através de imunohistoquímica e encontrou uma correlação negativa significativa entre o status do linfonodo e a presença da proteína BRCA1 nuclear. Ainda, verificou-se uma perda progressiva significativa da expressão da BRCA1 nuclear associada ao alto grau histológico tumoral (TAYLOR *et al.*, 1998).

Tumores de alto grau geralmente apresentam baixos níveis de BRCA1 e altas taxas de proliferação, havendo também correlação positiva entre níveis baixos de BRCA1, ausência de receptor de estrogênio e presença de metástase. Ainda, uma associação de baixa expressão de *BRCA1* com níveis elevados de ERBB2 (*Erythoblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) e também um efeito adverso na sobrevida livre da doença têm sido verificados em cânceres de mama. Estudos similares têm correlacionado a diminuição dos níveis de BRCA1 com o desenvolvimento de câncer de ovário esporádico. Isso está de acordo com a função que este gene desempenha como supressor de tumor em ambos os tecidos, mamário e do ovário (LEE *et al.*, 1999; SEERY *et al.*, 1999; YOSHIKAWA *et al.*, 1999, RUSSELL *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001a).

Desse modo, estas observações sugerem um modelo no qual a perda da atividade de BRCA1, seja por mutações germinativas ou por desregulação devido a outros fatores, induz a formação tumoral em tecidos alvos específicos (MUELLER; ROSKELLEY, 2003).

1.3.2 Alterações Genéticas e Expressão de *FHIT*

O gene *FHIT* foi mapeado na região 3p14.2 e recebeu esse nome por conter o sítio frágil mais conhecido do genoma humano, o FRA3B (OHTA *et al.*, 1996). Os sítios frágeis são regiões cromossômicas suscetíveis a quebras, dando origem às instabilidades cromossômicas. Eles representam locais de difícil reparo do DNA após exposição a agentes mutagênicos ambientais. A presença do sítio frágil FRA3B

dentro do *FHIT* sugere que este gene pode apresentar susceptibilidade a rearranjos induzidos por uma grande variedade de carcinógenos ambientais (YANG *et al.*, 2002).

O gene *FHIT* é formado por 1,5 Mb e é o segundo maior gene humano conhecido, precedido pelo gene da distrofina com 2,4 Mb. O gene *FHIT* possui 10 exons e no exon 5 foi encontrado um códon de início de tradução ATG (FIGURA 4)(PEKARSKY *et al.*, 2002a). Os exons 5 a 9 codificam um mRNA de 1,1 kb, o qual pode ser regulado através de *splicing* alternativo e metilação do promotor do gene. A proteína FHIT apresenta 147 aminoácidos (16,8 kDa), e está localizada principalmente no citoplasma de células epiteliais ligada à tubulina e à uma ubiquitina de conjugação, a UBC9.

Resultados experimentais indicam que a proteína tem atividades de hidrolase para polifosfatodiosinas e supressora de tumor (OHTA *et al.*, 1996; SIPRASHVILI *et al.*, 1997; JI *et al.*, 1999; DUMON *et al.*, 2001; ISHII *et al.*, 2001), estando envolvida no controle do crescimento celular. A FHIT está associada com proteínas de pontos de checagem do ciclo celular como ATR e CHK1 e atua como alvo para a quinase SRC, sugerindo que esteja diretamente envolvida no ciclo celular. É, ainda, uma proteína pró apoptótica fortemente associada com FADD, caspase-8, MDM2 e TP53 (TERRY *et al.*, 2007).

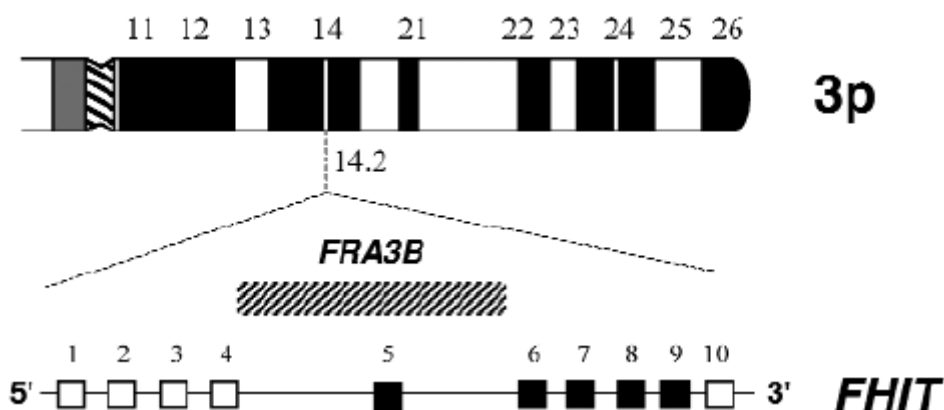


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DO GENE *FHIT* E REPRESENTAÇÃO DOS EXONS

FONTE: PEKARSKY *et al.* (2002a).

As análises de LOH mostram perda alélica na região 3p14 em cerca de 25% dos carcinomas mamários primários (AHMADIAN *et al.*, 1997; INGVARSSON, 2001). Deleções no gene *FHIT* também foram observadas em lesões pré-neoplásicas, sugerindo que alterações nesse gene estão relacionadas ao desenvolvimento inicial do câncer de mama (MAN *et al.*, 1996; HUEBNER; GARRISON; BARNES, 1998; SOZZI; HUEBNER; CROCE, 1998).

O gene *FHIT* é bastante expresso nos tecidos epiteliais normais e na maioria dos tecidos que originam os tumores sólidos mais comuns. Diversos trabalhos têm investigado a expressão deste gene em tumores sólidos e hematológicos demonstrando que o *FHIT* está inativado em aproximadamente 60% dos tumores humanos e em diversas doenças pré-malignas. A FIGURA 5 apresenta a expressão de *FHIT* em diversos tipos de tumores (PEKARSKY *et al.*, 2002b).

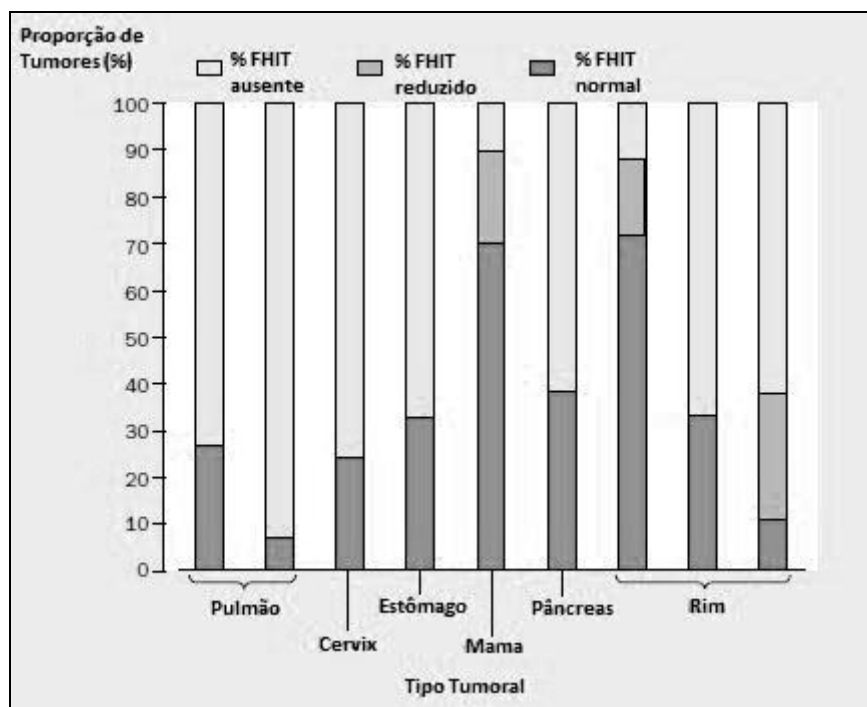


FIGURA 5 – EXPRESSÃO DE *FHIT* NOS TUMORES HUMANOS FREQUENTES

FONTE: PEKARSKY *et al.* (2002b). Com modificações.

NOTA: Os dados sobre tumores de pulmão incluem cânceres de células não-pequenas (barra da esquerda) e pré-neoplasia (barra da direita). Os dados sobre tumores de rim incluem cânceres papilares (barra da esquerda), cromofobe (barra central) e de células claras (barra da direita).

A perda de expressão da proteína FHIT tem um importante papel no desenvolvimento e progressão dos cânceres mamários (GULER *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2001b), avaliaram a expressão de FHIT em 166 pacientes com carcinomas mamários e encontraram perda ou redução significativa em 70 pacientes (42,2%), que apresentaram pior prognóstico e pior taxa de sobrevida. Em outro estudo, a redução ou perda da proteína FHIT foi encontrada em 40 a 80% dos cânceres de mama invasivos e 60% dos carcinomas *in situ* (GATALICA *et al.*, 2000). Análises univariadas de sobrevida livre da doença indicaram a perda de expressão da proteína FHIT como importante fator prognóstico em pacientes com câncer de mama inicial (GINESTIER *et al.*, 2003).

Wang *et al.* (2008) avaliaram 28 amostras de tecido normal, 28 amostras de hiperplasia atípica, 33 amostras de carcinoma ductal *in situ* e 51 amostras de carcinoma ductal invasor; para verificar a expressão dos genes *FHIT* e *WWOX*. O gene *WWOX* está localizado no cromossomo 16q23.3-24 na região do sítio frágil FRA16D. Os autores encontraram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão desses genes ao longo dos tecidos (sendo mais expresso no tecido normal e menos expresso no carcinoma invasor), indicando que a menor expressão desses genes pode estar envolvida na progressão tumoral. Os autores ainda sugerem que regimes de tratamento com objetivo de aumentar a expressão desses genes em pacientes com hiperplasia atípica ou carcinoma *in situ* poderiam prevenir a progressão para carcinomas invasivos.

Guler *et al.* (2009) avaliaram a expressão dos genes *FHIT* e *WWOX* em 837 amostras de câncer de mama através de imunohistoquímica. Além desses genes, também foram avaliados os fatores ativadores da proteína 2 ($Ap2\alpha$ e $Ap2\gamma$), citoqueratinas 5 e 6 (CH5/6), receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e a ERBB2. Foram encontradas reduções estatisticamente significativas na expressão dos genes *FHIT*, *WWOX* e $Ap2\gamma$, indicando um importante papel desses genes na patogênese da diferenciação inicial do câncer de mama.

Santos *et al.* (2004), avaliaram amostras de 34 pacientes portadoras de câncer de mama esporádico e encontraram alta frequência de LOH em marcadores microsatélites intragênicos ao *FHIT* e ao *BRCA1*. Embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas entre os parâmetros histopatológicos analisados (tipo histológico, grau, tamanho do tumor e presença de metástase em linfonodo axilar) e

a presença ou ausência de LOH, este trabalho indica que as perdas alélicas podem ser verificadas tanto em tumores de grau mais avançado como em tumores em estágios iniciais, ressaltando a importância da LOH no início do processo carcinogênico também nos casos esporádicos. Verificou-se ainda que, dos seis casos com LOH no marcador intragênico ao *FHIT*, quatro eram concomitantes ao *BRCA1*, sugerindo que as perdas alélicas iniciais do gene *BRCA1* podem levar a uma instabilidade genômica com perdas alélicas do *FHIT*.

Para avaliar a veracidade desta sugestão e a possível influência da perda concomitante destes genes, Silva Soares *et al.* (2010), avaliaram a LOH para marcadores microssatélites presentes nos locos dos genes *BRCA1* e *FHIT* em 82 amostras de câncer de mama esporádico. A LOH concomitante presente nas regiões de *BRCA1* e *FHIT* apresentou associação estatisticamente significativa com parâmetros de pior prognóstico como tumores maiores, linfonodos metastáticos, alto grau histológico, invasão vascular e receptores hormonais negativos. Além disso, a LOH concomitante teve uma frequência maior no grupo de indivíduos que tiveram uma sobrevida menor no período avaliado. Esses resultados sugerem que a perda concomitante dos locos *BRCA1* e *FHIT* está relacionada ao desenvolvimento de tumores mais agressivos.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma das doenças malignas responsável por uma importante morbidade e mortalidade na população feminina de todo o mundo e projeções para os próximos anos indicam um aumento no número de casos diagnosticados e de óbitos. Marcadores moleculares já estão sendo utilizados na clínica para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento de diversos tipos de câncer de mama. Entretanto é necessário aumentar o número e a eficiência de marcadores para um procedimento terapêutico direcionado, para que cada paciente possa receber a intervenção apropriada, objetivando um melhor prognóstico.

O gene *BRCA1* é um importante supressor de tumor envolvido em diversos processos em diferentes tipos de câncer. Entretanto devido às diferentes interações com outros genes em vias complexas, é necessário um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nessas interações, que pode ser alcançado através de estudos de expressão gênica. Estudos recentes indicam que o gene *FHIT* está envolvido principalmente na progressão tumoral e, portanto, com potencial de um novo marcador de relevância clínica.

Investigações do nosso grupo de pesquisa, principalmente utilizando a metodologia de LOH, levou a hipótese que a perda concomitante desses genes tem implicações na progressão tumoral. Sendo assim, como parte de um projeto mais amplo que pretende contribuir para o esclarecimento dos mecanismos desta interação, analisamos neste estudo a expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* em amostras de carcinomas mamários com LOH previamente estabelecida, objetivando avaliar se há correspondência entre a LOH, níveis de expressão do mRNA e a relação destes níveis com os parâmetros prognósticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* em amostras de carcinomas mamários, avaliando os respectivos níveis de expressão em relação à presença ou ausência de LOH, parâmetros histopatológicos e de evolução clínica (*follow up*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão dos genes *FHIT* e *BRCA1* em pacientes portadoras de carcinoma mamário, comparando estes dados com a presença ou ausência de LOH.
- Verificar a associação dos níveis de expressão com o grau histológico, tamanho do tumor, presença ou ausência de metástase em linfonodo, receptores hormonais, expressão de ERBB2, recidiva, metástase em sítios distantes e óbito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este trabalho foi realizado com 47 amostras de carcinomas mamários obtidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e Hospital de Clínicas de Curitiba (HC) (Paraná) após procedimento cirúrgico. Estas amostras foram processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LCHO) do Departamento de Genética da UFPR.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

Cada paciente recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e os formulários para a assinatura do Consentimento Informado Livre e Esclarecido (ANEXO 1). As informações sobre os parâmetros clínicos, histopatológicos e de evolução clínica avaliados, não puderam ser obtidas de todas as pacientes, resultando num número variável dessas informações para cada parâmetro (TABELA 1).

A idade média das pacientes foi de $54,5 \pm 17,5$ anos (29 – 89 anos). O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal invasor (45%, n=21), seguindo pelo carcinoma ductal invasor associado a carcinoma intraductal (32%, n=15). Os outros tipos compreenderam 23% (n=11) da amostra e estão apresentados na FIGURA 6.

A maioria dos tumores foi maior do que 20 mm (68%, n=32). Vinte e quatro (52%) pacientes apresentaram metástase nos linfonodos axilares, e em 22 (48%) pacientes as mesmas não foram observadas.

Os tumores classificados como de grau II foram mais frequentes (58%, n=26) do que os de grau III (27%, n=12) e grau I (15%, n=7).

Considerando os receptores hormonais, 35 (78%) dos tumores apresentaram receptor de estrogênio positivo e 10 (22%) negativo. Trinta e quatro (79%) tumores apresentaram receptor de progesterona positivo e nove (21%) negativo.

TABELA 1 – INFORMAÇÕES CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

Parâmetros	Pacientes: N (%)
Idade	
< 50 anos	18/46 (39)
≥ 50 anos	28/46 (61)
Subtipo Histológico	
Carcinoma Ductal Invasor	21/47 (45)
Carcinoma Ductal Invasor, Associado a Carcinoma Intraductal	15/47 (32)
Outros tipos	11/47 (23)
Tamanho do Tumor	
≤ 20 mm	15/47 (32)
> 20 mm	32/47 (68)
Metástase em Linfonodos	
Positivo	24/46 (52)
Negativo	22/46 (48)
Grau Histológico	
I	7/45 (15)
II	26/45 (58)
III	12/45 (27)
Receptor de Estrogênio (RE)	
Positivo	35/45 (78)
Negativo	10/45 (22)
Receptor de Progesterona (RP)	
Positivo	34/43 (79)
Negativo	9/43 (21)
Amplificação de ERBB2	
Positivo	19/42 (45)
Negativo	23/42 (55)
Recidiva	
Não	38/41 (93)
Sim	3/41 (7)
Metástase em sítios distantes	
Não	34/41 (83)
Sim	7/41 (17)
Óbito	
Não	35/43 (81)
Sim	8/43 (19)

FONTE: O Autor (2011).

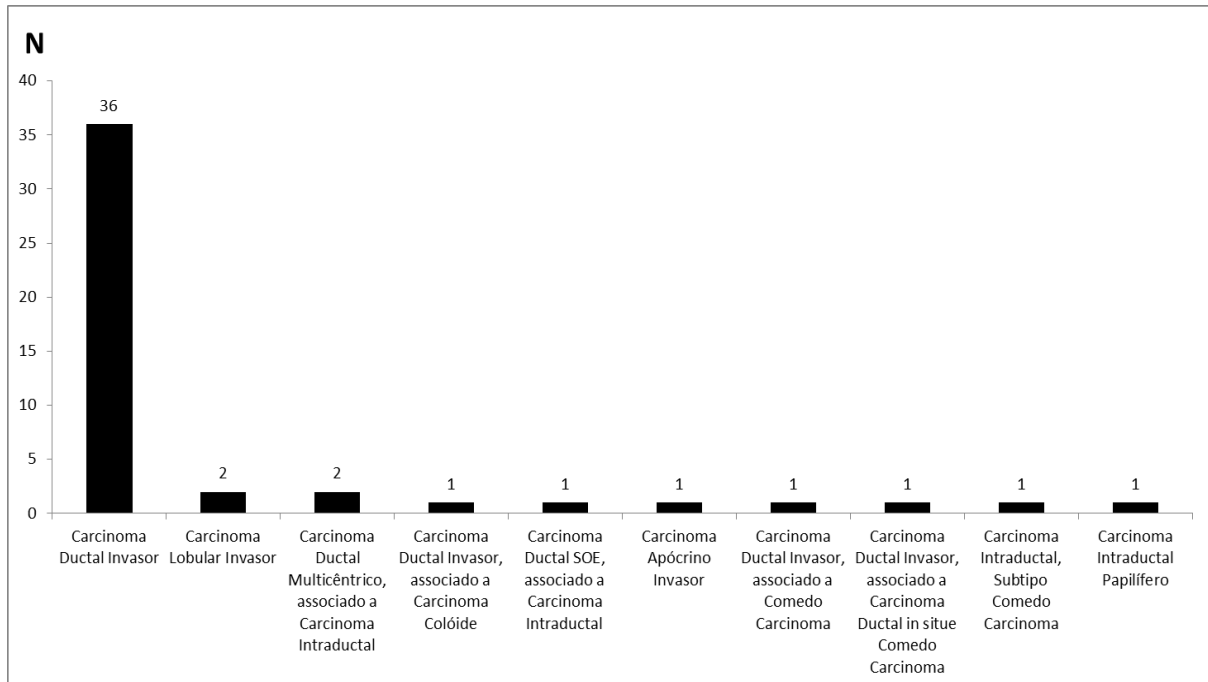


FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS NAS PACIENTES ANALISADAS
 FONTE: O Autor (2011).

Os tumores que não apresentaram a amplificação de *ERBB2* foram mais frequentes (55%, n=23) do que os que apresentaram (45%,n=19).

As informações sobre a evolução clínica das pacientes foram obtidas num período máximo de 96 meses (pacientes com cirurgia no ano de 2003) e mínimo de um mês, conforme a amostra ia sendo constituída, descontinuidade de tratamento ou óbito.

As pacientes que não apresentaram recidiva (93%, n=38) ou metástase (83%, n=34) durante o período avaliado foram as mais frequentes, respectivamente. As pacientes que apresentaram recidiva ou metástase foram 3 (7%) e 7 (17%), respectivamente. Durante o período de avaliação, oito (19%) pacientes foram a óbito em decorrência da doença.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DE TECIDO TUMORAL

As coletas de sangue periférico foram realizadas por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Foram coletados cerca de 10 ml de sangue de cada paciente, o qual foi colocado imediatamente em tubos estéreis *Vacutainer* (BD) contendo 7,2 mg de K₂ EDTA, e mantidos a 4 °C até o processamento.

Para o processamento do sangue, cerca de 5 ml de sangue periférico foram centrifugados com cerca de 14 ml de tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris; 110,2 g de MgCl₂; 5,8 g de NaCl e água destilada) a 2000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Este processo foi repetido até obter um botão de glóbulos brancos, livre de hemácias, ao qual foram adicionadas três gotas da solução PBS e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O material foi armazenado em geladeira até o momento da extração do DNA genômico.

As amostras de tecido tumoral foram coletadas pelo médico responsável no momento da retirada cirúrgica do tumor. Os fragmentos de tumor processados (retirada manual de tecidos não tumorais e fragmentação com o auxílio de tesouras e pinças estéreis) foram colocados em frascos estéreis identificados e estocados em condições ideais de conservação (-80 °C), para posterior extração de DNA e RNA.

4.3 ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)

4.3.1 Extração e Amplificação do DNA de Sangue Periférico e Tumoral

O método de extração do DNA sanguíneo utilizado foi o de *salting out*, conforme o protocolo de Bignon; Fernandez-Vinã (1997). Ao final do processo, as amostras de DNA foram diluídas em 100 µL de água ultrapura e armazenadas a -20

°C até o momento da amplificação pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). O método de extração do DNA tumoral utilizado foi o de fenol-clorofórmio. Em um tubo de microcentrífuga contendo os fragmentos do tumor foram adicionados 80 µL de tampão da proteinase K 5X, 40 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL), 20 µL de solução de SDS 20% e 240 µL de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo Vortex, seguida de incubação no bloco de aquecimento a 60 °C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com procedimento. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 ml de etanol absoluto para a precipitação do DNA e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70%. O tubo foi invertido delicadamente várias vezes antes de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o material foi colocado em bloco de aquecimento a 55 °C por 10 minutos para a evaporação da água. Após, a amostra de DNA foi ressuspensa em 30 a 50 µL de água ultrapura e levada ao bloco de aquecimento a 95 °C por 10 minutos, para que a solução de DNA se tornasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20 °C.

Para a quantificação das amostras de DNA obtidas, foi utilizada a plataforma de quantificação de DNA dupla fita *Qubit Fluorometer (Invitrogen)*, conforme especificações do fabricante.

A PCR foi utilizada para a amplificação dos marcadores microssatélites em regiões específicas do braço curto do cromossomo 3 e do braço longo do cromossomo 17. O QUADRO 1 apresenta informações sobre a localização, frequência de heterozigose, tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb), os iniciadores e o fluorocromo utilizado para cada marcador microssatélite. Todos os produtos de amplificação foram obtidos utilizando as mesmas condições, conforme descrito no QUADRO 2:

Marcador	Localização	Heterozigose (Genome Database) (%)	Tamanho (pb)	Iniciadores	Fluorocromo
D3S1300	3p14.2	0,83	217-241 pb	5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3' 5'-GTAGACCCCTTACCG-3'	FAM
D3S1234	3p14.2	0,66	99-121 pb	5'-CCTGTGAGACAAAGCAAGAC-3' 5'-GACATTAGGCACAGGGCTAA-3'	FAM
D3S4103	3p14.2	0,83	165-185 pb	5'-TTCTACTGCAATCCAGCCTGG-3' 5'-GCCTTGGGTAGATTTATACCT-3'	HEX
D17S1323	17q21	0,48	155 pb	5'-TAGGAGATGGATTATTGGTG-3' 5'-AAGCAACTTTGCAATGAGTG-3'	FAM
D17S1322	17q21	0,67	130 pb	5'-CTAGCCTGGGCAACAAACGA-3' 5'-GCAGGAAGCAGGAATGGAAC-3'	HEX

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES UTILIZADOS E INICIADORES

FONTE – O Autor (2011).

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME NA REAÇÃO
DNA molde	20,0 ng/μL	40,0 ng	2,0 μL
Tampão	10,0 X	1,0 X	1,0 μL
MgCl ₂	50,0 mM	1,0 mM	0,2 μL
dNTPs	2,0 mM de cada	0,1 mM de cada	0,5 μL
Iniciador <i>forward</i>	8,0 mM	0,8 mM	1,0 μL
Iniciador <i>reverse</i>	8,0 mM	0,8 mM	1,0 μL
Taq DNA polimerase	5,0 U/ μL	0,5 U	0,1 μL
H ₂ O Ultra Pura		Para completar 10,0 μL de reação	10,0 μL

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE PCR

FONTE – O Autor (2011).

Os ciclos de amplificação foram: 96 °C por 5 minutos (desnaturação do DNA inicial); 30 ciclos de 96 °C por 20 segundos (desnaturação), 55 °C por 30 segundos (hibridização dos iniciadores) e 72 °C por 40 segundos (extensão); 72 °C por 20 minutos (extensão final), usando o termociclador *Eppendorf Mastercycle Gradient*.

Após a amplificação por PCR, o número das amostras e as condições de corrida foram transferidos para o computador para a análise. Em seguida, a placa de injeção contendo as amostras foi montada conforme as condições para genotipagem. Após uma pré-corrída, a placa foi levada ao sequenciador *MEGABACE 1000*.

As condições de corrida foram: injeção a 3 KV por 80 segundos e corrida a 8 KV por 80 minutos. Após a eletroforese na presença do marcador padrão ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*), os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *Software Fragment Profiler 1.2 (Amershan Biosciences)*.

4.3.2 Análise de LOH

Os marcadores informativos para cada paciente foram avaliados quanto à presença ou ausência de LOH no tecido tumoral. Amostras cujos marcadores apresentaram-se homozigotos no sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador. A LOH foi determinada matematicamente utilizando-se a fórmula descrita por Schwarzenbach *et al.*, 2007:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}}$$

O alelo 1 é o que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 é o que possui maior tamanho em pares de bases. Um valor de $\text{LOH} \leq 0,60$ indica que a

amostra tumoral apresenta pelo menos 40% de perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de LOH $\geq 1,67$ indica perda de pelo menos 40% do alelo de menor tamanho na amostra tumoral. Foi considerada LOH quando o valor obtido foi $\leq 0,60$ ou $\geq 1,67$. Todas as análises foram repetidas e só foi considerada LOH quando os resultados obtidos através da fórmula acima citada foram compatíveis nas duas análises.

Os critérios utilizados para inclusão das pacientes nas classes experimentais deste trabalho foram: 1) a presença de LOH em pelo menos um dos marcadores microssatélites analisados para os genes *BRCA1* e *FHIT*, incluindo a paciente nas classes LOH_{BRCA1} ou LOH_{FHIT}. 2) a ausência de LOH em todos os marcadores microssatélites analisados, incluindo a paciente nas classes de ROH (retenção de heterozigose), ROH_{BRCA1} e ROH_{FHIT}.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.4.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit *RNeasy*[®] (*QIAGEN*). A partir de amostras de tecido tumoral previamente processadas foi realizado o procedimento de homogeneização de 30 mg de amostra juntamente com 600 μ L de tampão RLT. Todo o procedimento de homogeneização foi realizado com homogeneizador elétrico até ser obtido um extrato. Após centrifugação a 14.000 rpm em microcentrífuga por 3 minutos foi adicionado 1 volume de etanol 70%. Foram transferidos 700 μ L da amostra para tubos específicos do kit, compostos de coluna *spin* e tubo coletor de 2,0 mL. Essas amostras foram centrifugadas por 15 segundos a ≥ 10.000 rpm. O conteúdo do tubo coletor foi descartado. Adicionou-se 700 μ L de tampão RW1 e foi repetido o procedimento de centrifugação e descarte anterior. Adicionou-se 500 μ L de tampão RPE e foi repetido o procedimento de centrifugação e descarte anterior. Adicionou-se novamente 500 μ L de tampão RPE e centrifugou-se por 2 minutos a ≥ 10.000 rpm. O tubo coletor foi descartado com o conteúdo e um novo tubo coletor foi utilizado. O material foi centrifugado a de 14.000 rpm por 1

minuto, descartando-se o tubo coletor. Um novo tubo coletor foi utilizado e foram adicionados 40 μL de água livre de RNase. O material foi centrifugado por 1 minuto a ≥ 10.000 rpm. O conteúdo do tubo coletor foi transferido para um microtubo de armazenamento identificado para então proceder a leitura de concentração de RNA.

As concentrações de RNA obtidas pela extração foram determinadas utilizando o aparelho Nanodrop[®] 2000. A partir delas, as soluções uso de RNA foram preparadas com 50 ng/ μL .

4.4.2 Reação de Retrotranscrição

A reação de retrotranscrição para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. A síntese de cDNA foi catalisada pela transcriptase reversa *MultiScribe[®]* e foram usados iniciadores randômicos. Os componentes da reação e concentrações estão presentes no QUADRO 3 e as condições de reação no QUADRO 4.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
<i>RT Buffer</i>	10 X
<i>RT Random Primers</i>	10 X
<i>dNTPs Mix</i>	25 X
<i>MultiScribe[®] RT</i>	50 U/ μL
Amostra de RNA	50 ng/ μL (6 μL)
Água livre de RNase (completar 10 μL)	--

QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DE REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO

FONTE: O Autor (2011).

	PASSO 1	PASSO 2	PASSO 3	PASSO 4
TEMPERATURA	25 °C	37 °C	85 °C	4°C
TEMPO	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

QUADRO 4 – CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO PARA O TERMOCICLADOR EPPENDORF MASTERCYCLER

FONTE: O Autor (2011).

4.4.3 PCR em Tempo Real Quantitativa (qRT-PCR)

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

Por ser capaz de medir os produtos conforme estes são gerados, 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 requer a detecção em gel de eletroforese. Outras vantagens 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).

Para este 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 óptico do termociclador. Quando não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena, que 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* se ligam 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 diminui o 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 curve*, através da qual se pode verificar a existência de 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 °C; à medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com esse aumento de temperatura, diminui 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 7 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.

Nas três fases o sinal é detectado e aumenta de maneira diretamente proporcional ao aumento do produto de PCR. Na fase exponencial 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 gerado produto e o sinal fluorescente permanece relativamente constante; é o platô (*Applied Biosystems*, 2004; SCHEFE *et al.*, 2006).

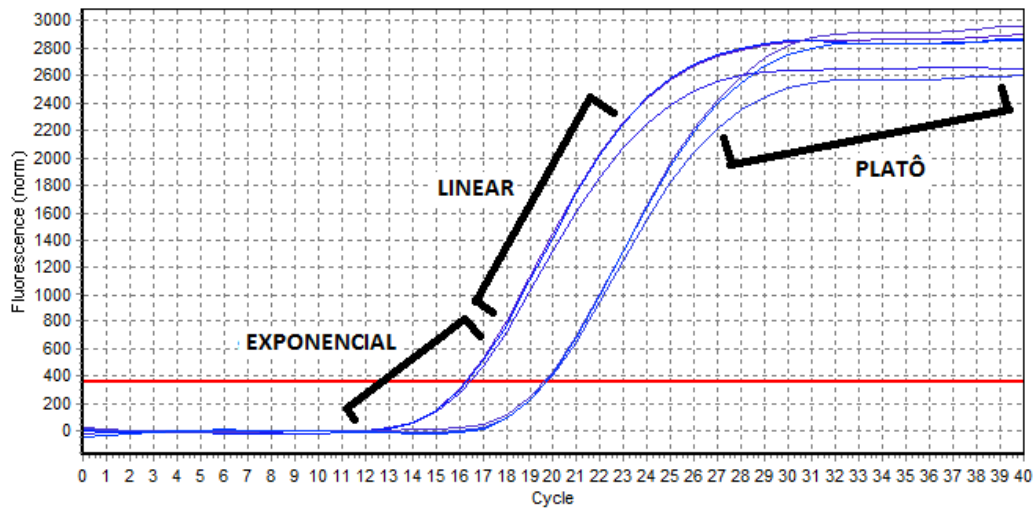


FIGURA 7 – GRÁFICO Δ RN (VARIAÇÃO NO SINAL FLUORESCENTE) X NÚMERO DE CICLOS MOSTRANDO UMA CURVA DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDA EM UMA REAÇÃO DE qPCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *FHIT* COM SUAS 3 FASES CARACTERÍSTICAS

FONTE: *Software realplex* EPPENDORF (2011).

4.4.4 Quantificação Relativa

A quantificação por qRT-PCR pode ser realizada por dois métodos diferentes: quantificação absoluta e relativa. Na quantificação absoluta através da presença de uma diluição seriada com concentração inicial conhecida de cada uma das diluições da série (curva padrão – *standard curve*) é possível identificar o número de cópias inicial do DNA molde. Este tipo de quantificação é indicado para estudos com poucos genes, para quantificação de carga viral, número de cópias inseridas em um organismo geneticamente modificado transgênico; possui a desvantagem de precisar da presença da curva padrão em toda placa de reação para os genes em estudo (SCHMITTGEN *et al.*, 2008).

Na quantificação relativa a expressão gênica de um determinado alvo é determinada em relação a uma amostra de referência, sendo o Método do Cq Comparativo (Cq - ciclo de quantificação; anteriormente chamado de Ct – *threshold cycle*) o mais indicado para estudos de expressão gênica com vários genes alvo.

Normalmente, neste método é feita a comparação entre a variação de Cq de dois grupos amostrais (teste e referência ou calibrador). Neste método, a curva padrão não é necessária para a quantificação, mas deve ser construída para a validação dos ensaios de qRT-PCR através da determinação da eficiência de reação para cada um dos genes do experimento (alvos e referências) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN *et al.*, 2008).

Este trabalho foi realizado através da quantificação relativa pelo Método do Cq Comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a normalização foi realizada segundo BUSTIN *et al.*, (2009). O equipamento utilizado neste trabalho foi o *mastercycler* EPPENDORF e os dados de quantificação foram obtidos a partir do *software* realplex EPPENDORF.

4.4.5 Determinação dos Genes de Referência

Os genes de referência (anteriormente denominados de controles internos, controles endógenos ou genes *housekeeping*) são genes que possuem expressão estável entre as classes experimentais e fazem a normalização de fatores incontrolláveis inerentes a processos da técnica como número de células utilizadas na extração de RNA ou alterações nos micro-ambientes dos tecidos dos quais são obtidas as amostras (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para a determinação dos melhores genes de referência foram realizados ensaios com três genes candidatos: *GAPDH*, *CICLOFILINA* e β -*ACTINA*. Estes foram testados em amostras pertencentes as classes experimentais deste trabalho e os resultados foram analisados no *software* DataAssist[®] (Disponível em <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2;catID=606580>). O resultado da análise está representado na FIGURA 8. Os genes candidatos mais estáveis apresentam valores próximos de um (os valores referência para cada gene estão indicados na legenda da figura). Desse modo, os dois genes de referência candidatos mais estáveis escolhidos foram a *CICLOFILINA* e β -*ACTINA*.

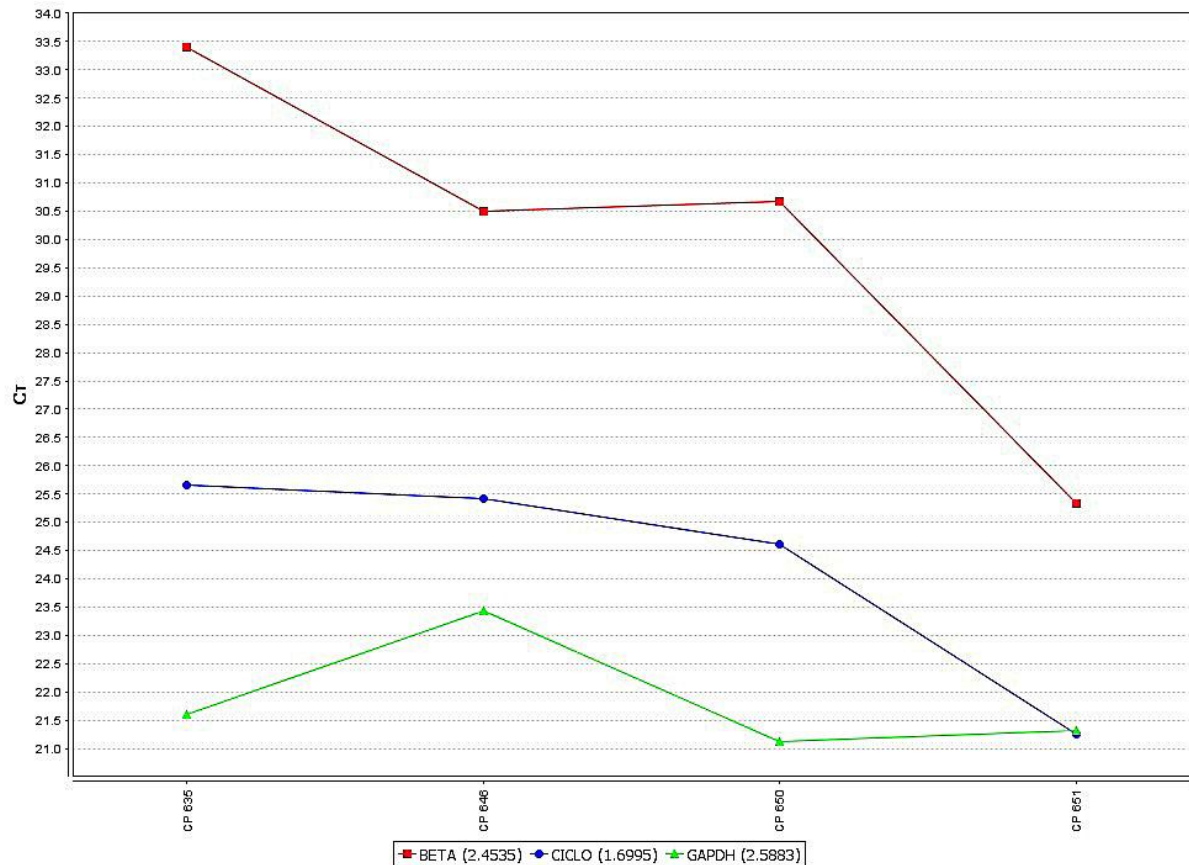


FIGURA 8 – GRÁFICO GERADO PELO SOFTWARE DataAssist® PARA ESTABILIDADE DOS GENES DE REFERÊNCIA CANDIDATOS GAPDH, CICLOFILINA e β -ACTINA

FONTE: Software DataAssist® (2011).

4.4.6 Oligonucleotídeos Iniciadores e Reação de qRT-PCR

Observando-se regras específicas para a construção de iniciadores para ensaios de qRT-PCR, foram obtidos quatro pares de iniciadores para os genes CICLOFILINA, β -ACTINA, BRCA1 e FHIT (QUADRO 5). Os dois primeiros foram utilizados na reação como genes de referência. A reação de qRT-PCR foi padronizada conforme o QUADRO 6 para os reagentes e QUADRO 7 para as condições de reação no termociclador *Mastercycle ep realplex* EPPENDORF.

GENES	INICIADORES
<i>CICLOFILINA</i>	5'-GACCCAACACAAATGGTTCC-3' 5'-TTTCACTTTGCCAAACACCA-3'
<i>β-ACTINA</i>	5'-CCTACTGCGTGGTGTGGAC-3' 5'-TGACTCCTGTGGATGTGCAG-3'
<i>BRCA1</i>	5'-TTGATGTGGAGGAGCAACAG-3' 5'-GAGGCTGATTCCAGATTCCA-3'
<i>FHIT</i>	5'-GGAAACCTGTGGTACCAGGAC-3' 5'-CAAATCGGCCACCTTCATCAG-3'

QUADRO 5 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES DE qRT-PCR

FONTE: O Autor (2011).

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME NA REAÇÃO
cDNA	3,0 ng/ μ L	0,6 ng/ μ L	5 μ L
Master MIX SYBR Green	2X	1X	12,5 μ L
Iniciadores		(<i>foward</i> – <i>reverse</i>)	(<i>foward</i> / <i>reverse</i>)
CICLOFILINA	10 pmol/ μ L	0,2 pmol/ μ L – 0,6 pmol/ μ L	0,50 μ L / 1,5 μ L
β-ACTINA	10 pmol/ μ L	0,1 pmol/ μ L – 0,2 pmol/ μ L	0,25 μ L / 0,5 μ L
BRCA1	10 pmol/ μ L	0,2 pmol/ μ L – 0,2 pmol/ μ L	0,50 μ L / 0,5 μ L
FHIT	10 pmol/ μ L	0,1 pmol/ μ L – 0,2 pmol/ μ L	0,25 μ L / 0,5 μ L
H₂O Ultra Pura	-	-	para completar o volume final
Volume Final	-	-	25 μ L

QUADRO 6 – COMPOSIÇÃO DE REAÇÃO DE qRT-PCR

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os valores de concentração na reação dos iniciadores foram determinados para otimizar a eficiência da reação após titulação realizada com diversas combinações de concentrações.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3 (repete 40X)	Passo 4
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C e 60 °C	Curva de <i>melting</i>
Tempo	2 min	10 min	15 s e 1 min	

QUADRO 7 – CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE qRT-PCR

FONTE: O Autor (2011).

NOTA: O Passo 4 é importante para o controle de qualidade da reação principalmente com relação à amplificação de produto inespecífico e dímeros de iniciadores.

4.4.7 Validação da qRT-PCR pelo Método da Curva Padrão

A validação dos ensaios foi realizada pelo Método da Curva Padrão (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para a construção das curvas padrão foi realizada uma pré-amplificação nas condições indicadas nos QUADROS 7 e 8, com os iniciadores específicos para cada um dos quatro genes deste estudo. O produto amplificado foi submetido a uma corrida de eletroforese em gel de agarose 2,5 % a 80 V por 50 minutos. O gel foi corado com Brometo de Etídeo 0,1% e as bandas referentes aos produtos foram recortadas do gel com auxílio de bisturi e lâmina estéreis no transiluminador de luz UV. O produto amplificado foi purificado através do Kit *AxyPrep DNA Gel Extraction*[®] (AXYGEN). A concentração obtida ([conc.]) pela purificação foi determinada utilizando o aparelho Nanodrop[®] 2000 e então foi determinado o valor do Fator de Diluição inicial (F.D.) para a realização das diluições seriadas para a construção das curvas padrão, conforme as fórmulas a seguir:

$$F.D. = \frac{(N^{\circ} \text{ de moléculas})}{1 \times 10^8}$$

$$N^{\circ} \text{ de moléculas} = \frac{(6,023 \times 10^{23} [\text{conc.}] \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 10^{-6})}{P.M. *}$$

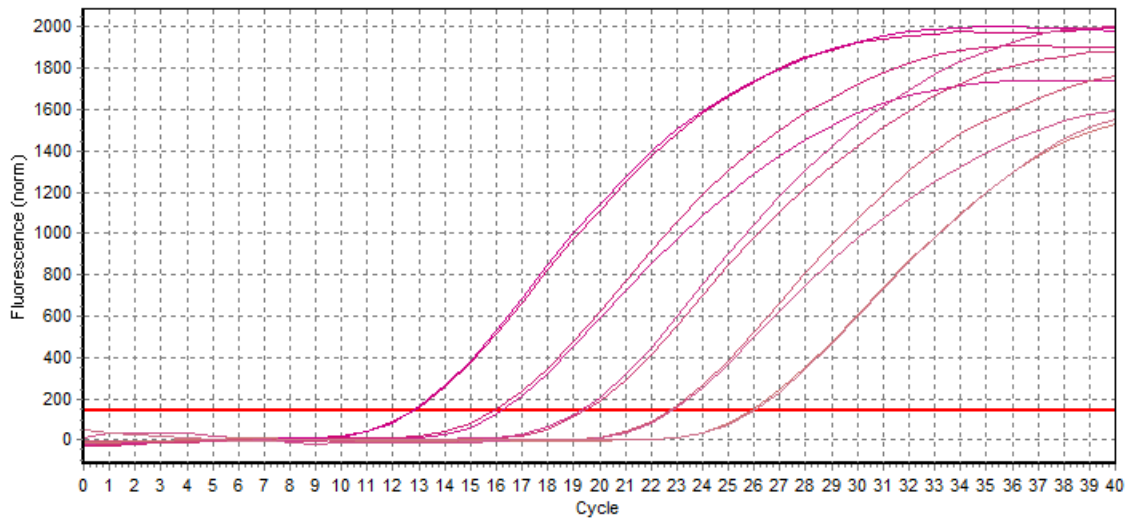
$$P.M.* = (N^{\circ} \text{ de pares de bases do fragmento}) \times 330$$

* P.M. – Peso Molecular

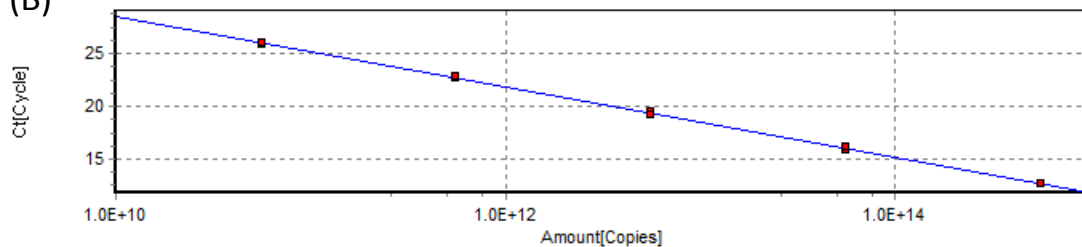
Em todas as reações de curva padrão foram utilizadas cinco diluições seriadas na ordem de 10X, um exemplo de uma curva padrão está ilustrado na FIGURA 9. Os valores de *slope*, intercessão com eixo Y, eficiência de reação e R², são apresentados na TABELA 2.

Os ensaios para os genes foram validados. Os dados de validação dos ensaios são apresentados na TABELA 3.

(A)



(B)

FIGURA 9 – CURVA PADRÃO DO GENE *FHIT* COM CINCO DILUIÇÕES SERIADASFONTE: *Software realplex 1.5* EPPENDORFF (2011).

NOTA: (A) Gráfico de amplificação em escala não logarítmica. (B) Gráfico de eficiência de reação.

TABELA 2 – DADOS DE *slope*, INTERCESSÃO COM EIXO Y, EFICIÊNCIA DE REAÇÃO E R^2 , PARA AS CURVAS PADRÃO CONSTRUÍDAS PARA VALIDAÇÃO DE EXPERIMENTOS COM OS GENES β -ACTINA, CICLOFILINA, BRCA1 E *FHIT*

GENES	<i>Slope</i>	Intercessão com Eixo Y	Eficiência de Reação	R^2
<i>CICLOFILINA</i>	-3,323	42,48	1,00	1,00
β -ACTINA	-3,315	42,75	1,00	0,98
<i>BRCA1</i>	-3,368	61,54	0,98	0,99
<i>FHIT</i>	-3,312	53,35	1,00	0,99

FONTE – O Autor (2011).

TABELA 3 – VALORES DE R² PARA VALIDAÇÃO DAS REAÇÕES DE qRT-PCR PARA OS GENES DE REFERÊNCIA E GENES ALVOS

GENES	<i>BRCA1</i>	<i>FHIT</i>
<i>β-ACTINA</i>	0,1025	0,0281
<i>CICLOFILINA</i>	0,0818	0,0547

FONTE: O Autor (2011).

NOTA: Valores de R² devem estar entre -0,1 e 0,1 para validação das reações de qRT-PCR para o Método do Cq Comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de expressão gênica foi realizada no *software* DataAssist[®] através do Método do Cq Comparativo (XIA *et al.*, 2010). O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre a expressão do gene *BRCA1* e do gene *FHIT*. A significância das diferenças entre as médias de quantificação de expressão entre as diversas classes estudadas foi analisada através do teste *t* de Student.

Para as análises do coeficiente de correlação e do teste *t* foi utilizado o pacote estatístico Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). O nível de significância considerado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Foram estudadas 47 amostras de carcinomas mamários. O número de pacientes variou nos parâmetros analisados, devido a não obtenção de informações (TABELA 1). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada através do Método do Cq Comparativo conforme descrito no item 4.4. O QUADRO 8 apresenta as informações sobre as análises laboratoriais realizadas em cada uma das pacientes, demonstrando a presença ou ausência de LOH e para quais dos genes a análise de expressão foi bem sucedida.

A FIGURA 10 apresenta o gráfico comparativo da expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* nos 32 pacientes em que a quantificação de ambos os genes foi possível. A média de expressão do gene *FHIT* ($0,0299 \pm 0,0377$, $n=44$) foi aproximadamente 3 vezes maior do que a do gene *BRCA1* ($0,0099 \pm 0,0054$, $n=35$), sendo a diferença estatisticamente significativa ($t' = 3,428 > t_c = 2,027$).

O coeficiente de correlação estimado entre a quantificação da expressão do gene *BRCA1* e do gene *FHIT* foi de 0,65 ($p < 0,0001$) o que demonstra uma interdependência da expressão de ambos os genes (FIGURA 11).

A TABELA 4 apresenta os valores das comparações entre as médias de expressão nas classes com presença e ausência de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT*. Na comparação entre as médias de expressão do gene *BRCA1* nas classes LOH_{BRCA1}/LOH_{FHIT} ($n=4$) e ROH_{BRCA1}/ROH_{FHIT} ($n=7$), a segunda classe apresentou uma expressão média maior (1,13), entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa ($t' = 0,415 < t_c = 2,517$). Resultados no mesmo sentido foram observados para o gene *FHIT* nas mesmas classes (1,04 e $t = 0,049$; $p > 0,90$, respectivamente). O número de pacientes em cada classe foi reduzido devido à classificação da amostra de acordo com a presença de ROH e LOH concomitante e obtenção da expressão gênica pelo procedimento de qRT-PCR (QUADRO 8). A comparação entre as médias de expressão nas classes de LOH e ROH em *BRCA1* e *FHIT* também foram realizadas isoladamente, não se observando diferença estatisticamente significativa entre as mesmas (TABELA 4).

Código	BRCA1	FHIT	Expressão BRCA1	Expressão FHIT
CP 408	ROH	LOH	0,0109	0,0128
CP 433	LOH	LOH	0,0094	0,0015
CP 446	ROH	LOH	0,0083	0,0028
CP 459	NI	LOH	0,0085	0,0025
CP 460	NI	LOH	0,0085	0,0042
CP 470	NI	LOH	0,0036	0,0044
CP 475	NI	ROH	0,0251	0,0231
CP 501	NI	ROH	0,0083	0,0024
CP 525	LOH	ROH	0,0072	0,0059
CP 529	ROH	ROH	0,0132	0,0406
CP 536	ROH	ROH	0,0084	
CP 553	ROH	ROH	0,0234	0,0266
CP 557	NI	ROH	0,0111	0,0201
CP 558	ROH	ROH	0,0051	0,0022
CP 559	NI	ROH	0,0177	0,0929
CP 560	NI	ROH	0,0054	0,0011
CP 561	NI	ROH	0,0053	0,0028
CP 563	ROH	ROH	0,0096	0,0048
CP 567	NI	ROH	0,0062	0,0054
CP 572	NI	ROH	0,0063	
CP 577	LOH	LOH	0,0114	0,0217
CP 578	LOH	ROH	0,0108	0,0209
CP 583	ROH	ROH	0,0058	0,0039
CP 587	NI	ROH	0,0075	0,0032
CP 588	LOH	ROH	0,0171	0,0194
CP 589	NI	ROH	0,0082	0,0080
CP 590	LOH	LOH	0,0073	0,0081

QUADRO 8 – INFORMAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA PACIENTE
(continua)

Código	BRCA1	FHIT	Expressão BRCA1	Expressão FHIT
CP 591	NI	ROH	0,0063	0,0069
CP 592	NI	ROH	0,0089	0,0101
CP 593	ROH	ROH	0,0068	0,0038
CP 594	LOH	ROH	-	0,0125
CP 600	LOH	ROH	-	0,1381
CP 602	NI	ROH	0,0236	0,0194
CP 603	NI	LOH	-	0,0279
CP 605	LOH	LOH	-	0,0744
CP 606	ROH	ROH	0,0047	0,0049
CP 607	ROH	ROH	-	0,0815
CP 610	LOH	LOH	0,0080	0,0227
CP 612	LOH	NI	0,0067	-
CP 617	ROH	ROH	0,0128	0,0733
CP 635	NI	LOH	-	0,0098
CP 641	ROH	ROH	-	0,1006
CP 650	ROH	ROH	-	0,1019
CP 651	NI	ROH	-	0,1025
CP 652	ROH	LOH	-	0,1229
CP 653	NI	ROH	-	0,0277
CP 654	NI	LOH	-	0,0316

QUADRO 8 – INFORMAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES REALIZADAS EM CADA PACIENTE (conclusão)

FONTE: O Autor (2011).

LEGENDA: LOH = perda de heterozigose; ROH = retenção de heterozigose; NI = não informativos.
Os valores indicam a média de expressão relativa dos genes em cada indivíduo.

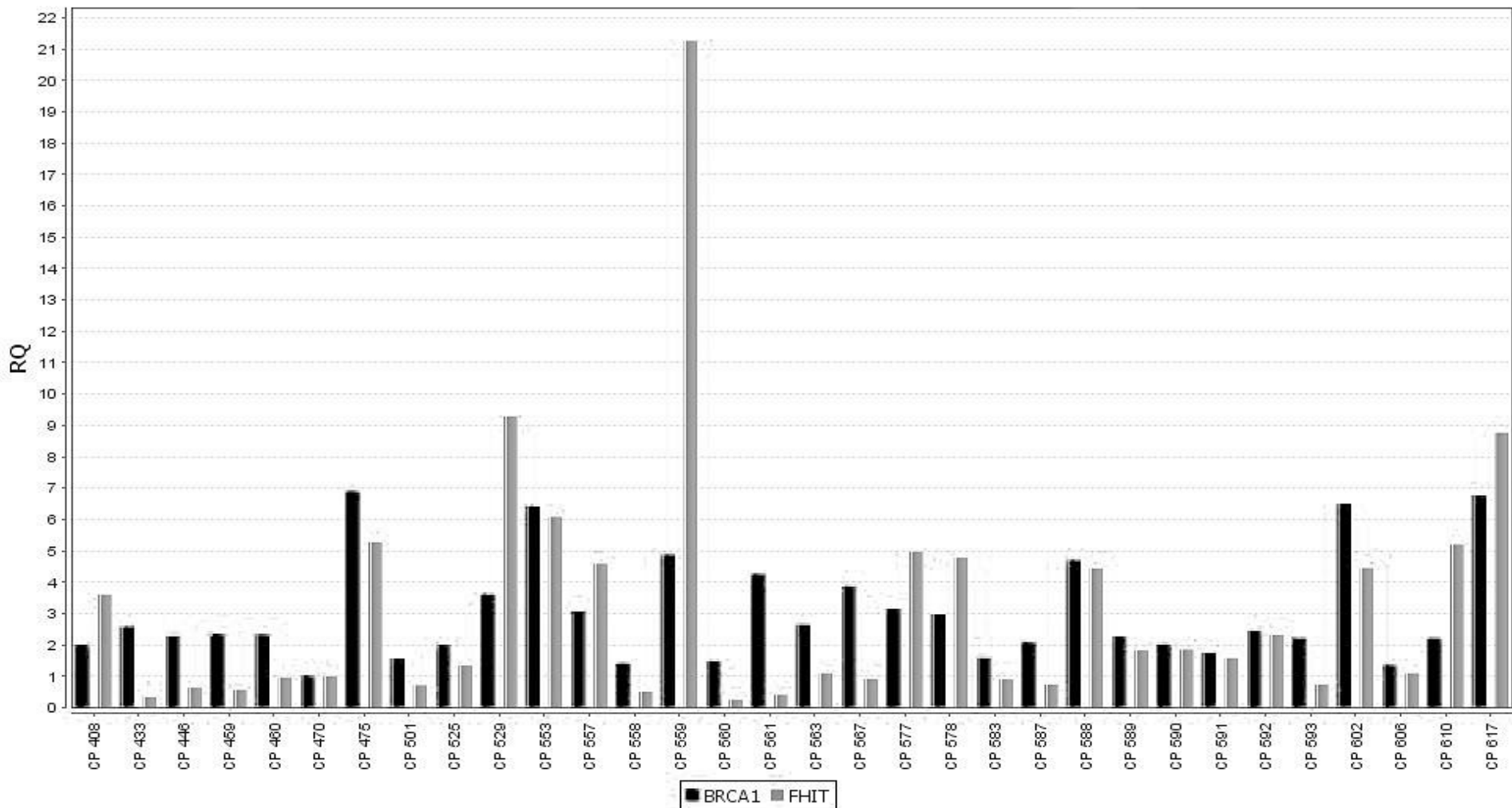


FIGURA 10 – EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *BRCA1* E *FHIT*

FONTE: *Software DataAssist*® (2011)

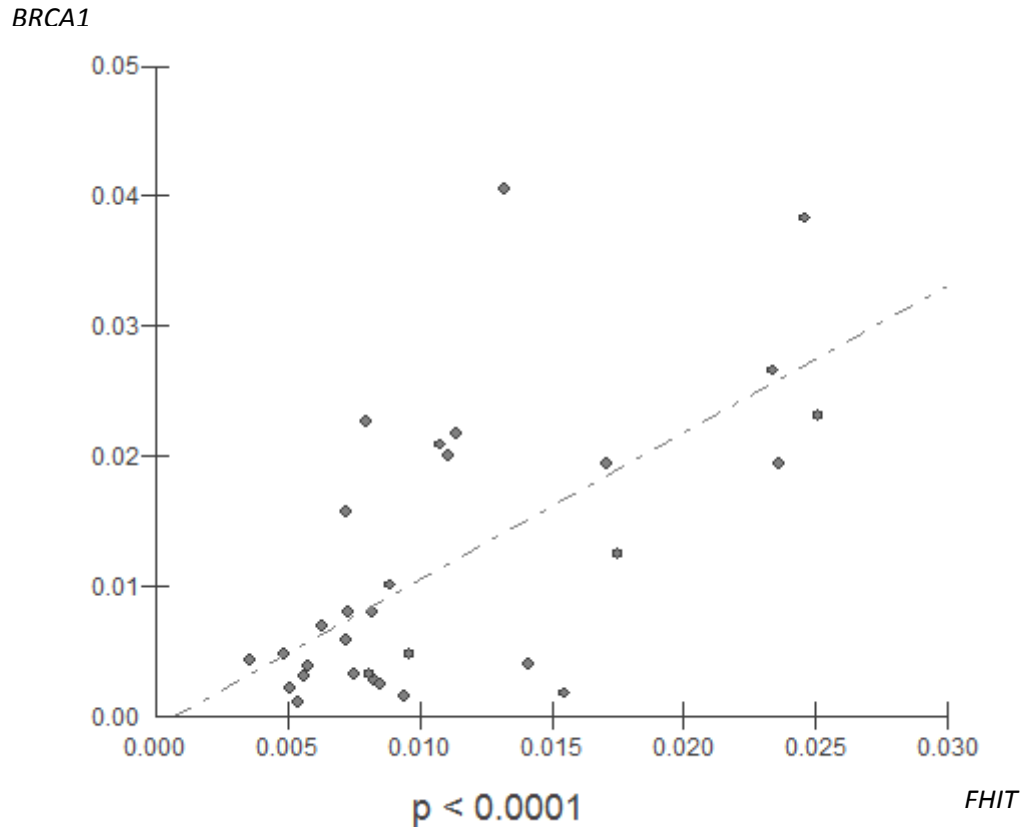


FIGURA 11 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON ($r = 0,65$)

FONTE: Bioestat 5.0 (AYRES, *et al.*, 2007)

TABELA 4 – VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E DO TESTE t OBTIDOS NAS COMPARAÇÕES ENTRE CLASSES COM LOH OU ROH CONCOMITANTE E ISOLADA PARA OS GENES *BRCA1* E *FHIT*

CLASSES (n)	MÉDIAS \pm DP	RQ	TESTE t
<i>Médias de expressão de BRCA1 e presença ou ausência de LOH</i>			
LOH _{BRCA1} /LOH _{FHIT} (4) vs ROH _{BRCA1} /ROH _{FHIT} (7)	0,0090 \pm 0,0018 vs 0,0102 \pm 0,007	1,13	$t' = 0,415 < t_c = 2,517$
LOH _{BRCA1} (8) vs ROH _{BRCA1} (11)	0,0097 \pm 0,0034 vs 0,0099 \pm 0,0053	1,02	$t = 0,02$; $p > 0,90$
<i>Médias de expressão de FHIT e presença ou ausência de LOH</i>			
LOH _{BRCA1} /LOH _{FHIT} (4) vs ROH _{BRCA1} /ROH _{FHIT} (7)	0,0135 \pm 0,0104 vs 0,0140 \pm 0,0174	1,04	$t = 0,049$; $p > 0,90$
LOH _{FHIT} (14) vs ROH _{FHIT} (30)	0,0248 \pm 0,0342 vs 0,0322 \pm 0,0396	1,30	$t = 0,603$; $p > 0,50$

FONTE: O Autor (2011).

NOTA: Classes Referência - LOH_{BRCA1}/LOH_{FHIT}, LOH_{BRCA1} e LOH_{FHIT}

A TABELA 5 apresenta as classes de referência, os valores das médias de expressão, da quantificação relativa (RQ) e do teste *t* para o gene *BRCA1* nas comparações com os parâmetros histopatológicos e de evolução clínica. Foram avaliadas 35 pacientes para a expressão do gene *BRCA1* (FIGURA 12). Nas comparações entre as médias da expressão do gene *BRCA1* nos diferentes parâmetros histopatológicos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, exceto para a presença de metástase em linfonodos que apresentou uma média maior (1,52) do que a observada nas pacientes sem comprometimento dos linfonodos, com diferença estatisticamente significativa, apresentando a maior diferença nestas comparações. As médias dos parâmetros de evolução clínica (recidiva, metástase em sítios distantes e óbito) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (TABELA 5).

A TABELA 6 apresenta as classes de referência, os valores das médias de expressão, da quantificação relativa (RQ) e do teste *t* para o gene *FHIT* nas comparações com os parâmetros histopatológicos e de evolução clínica. Foram avaliadas 44 pacientes para a expressão do gene *FHIT* (FIGURA 13). Nas comparações entre as médias da expressão do gene *FHIT* nos diferentes parâmetros histopatológicos e de evolução clínica não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

TABELA 5 – CLASSE DE REFERÊNCIA, VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E TESTE *t* PARA O GENE *BRCA1* NAS COMPARAÇÕES NOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA

CLASSES (N)	REF ¹	MÉDIAS	RQ ²	TESTE <i>T</i>
Metástase em Linfonodos				
Positivo (18) vs Negativo (16)	Positivo	0,0081±0,0019 - 0,0123±0,0071	1,52	<i>t</i>'=2,33 > <i>t</i>_c=2,13
Grau Histológico				
Grau I (5) vs Grau II (20)	Grau I	0,008±0,002 - 0,011±0,0063	1,38	<i>t</i> '=1,80 < <i>t</i> _c =2,29
Grau I (5) vs Grau III (8)	Grau I	0,008±0,002 - 0,0088±0,0040	1,10	<i>t</i> = 0,12; p>0,90
Grau II (20) vs Grau III (8)	Grau III	0,011±0,0063 - 0,0088±0,0040	1,25	<i>t</i> = 0,912; p>0,30
Grau I e II (25) vs Grau III (8)	Grau III	0,0104±0,0058 - 0,0088±0,0040	1,18	<i>t</i> '=0,001; p>0,95
Grau I (5) vs Grau II e III (28)	Grau I	0,008±0,002 - 0,0104±0,0058	1,30	<i>t</i> '=1,69 < <i>t</i> _c =2,34
Tamanho do Tumor				
≤ 20 mm (11) vs > 20 mm (24)	> 20 mm	0,0099±0,0049 - 0,01±0,0057	1,01	<i>t</i> = 0,045; p>0,95
Receptores Hormonais				
RE(+) (28) vs RE(-) (5)	Negativo	0,01±0,0052 - 0,0076±0,0026	1,31	<i>t</i> = 0,992; p>0,30
RP(+) (26) vs RP(-) (5)	Positivo	0,0094±0,0041 - 0,0081±0,0055	1,16	<i>t</i> = 0,618; p>0,50
Amplificação de ERBB2				
Positivo (15) vs Negativo (15)	Negativo	0,0106±0,0052 - 0,0078±0,0027	1,36	<i>t</i> = 1,87; p>0,05
Recidiva				
Sim (3) vs Não (27)	Não	0,0106±0,0061 - 0,0093±0,0043	1,14	<i>t</i> = 0,481; p>0,60
Metástase em sítios distantes				
Sim (6) vs Não (24)	Sim	0,0088±0,0046 - 0,0096±0,0044	1,09	<i>t</i> = 0,36; p>0,70
Óbito				
Sim (7) vs Não (23)	Sim	0,0098±0,0049 - 0,0077±0,0014	1,27	<i>t</i> '=1,10 < <i>t</i> _c =2,44

FONTE: O Autor (2011).

NOTA: ¹ Atribuído valor 1,0 para referência. ² Valores de quantificação relativa demonstrando o quanto a média de expressão é maior que a classe referência.

TABELA 6 – CLASSE DE REFERÊNCIA, VALORES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO, DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RQ) E TESTE *t* PARA O GENE *FHIT* NAS COMPARAÇÕES NOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE EVOLUÇÃO CLÍNICA

CLASSES (N)	REF ¹	MÉDIAS _± DP	RQ ²	TESTE <i>t</i>
Metástase em Linfonodos				
Positivo (22) vs Negativo (21)	Positivo	0,0241 _± 0,0379 - 0,0371 _± 0,0377	1,54	<i>t</i> = 1,124; <i>p</i> >0,25
Grau Histológico				
Grau I (7) vs Grau II (23)	Grau I	0,0174 _± 0,0285 - 0,0327 _± 0,0411	1,88	<i>t</i> = 0,917; <i>p</i> >0,30
Grau I (7) vs Grau III (12)	Grau I	0,0174 _± 0,0285 - 0,0302 _± 0,0372	1,74	<i>t</i> = 0,783; <i>p</i> >0,40
Grau II (23) vs Grau III (12)	Grau III	0,0327 _± 0,0411 - 0,0302 _± 0,0372	1,08	<i>t</i> = 0,179; <i>p</i> >0,80
Grau I e II (30) vs Grau III (12)	Grau I e II	0,0291 _± 0,0386 - 0,0302 _± 0,0372	1,04	<i>t</i> = 0,08; <i>p</i> >0,90
Grau I (7) vs Grau II e III (35)	Grau I	0,0174 _± 0,0285 - 0,0318 _± 0,0393	1,83	<i>t</i> = 0,923; <i>p</i> >0,25
Tamanho do Tumor				
≤ 20 mm (14) vs > 20 mm (30)	> 20 mm	0,0327 _± 0,0426 - 0,0285 _± 0,0359	1,15	<i>t</i> = 0,336; <i>p</i> >0,70
Receptores Hormonais				
RE(+) (34) vs RE(-) (9)	Negativo	0,0312 _± 0,0403 - 0,0251 _± 0,0298	1,24	<i>t</i> = 0,425; <i>p</i> >0,60
RP(+) (32) vs RP(-) (9)	Negativo	0,0306 _± 0,0395 - 0,0314 _± 0,0386	1,03	<i>t</i> = 0,051; <i>p</i> >0,95
Amplificação de ERBB2				
Positivo (17) vs Negativo (23)	Negativo	0,0342 _± 0,0414 - 0,0294 _± 0,0380	1,16	<i>t</i> = 0,381; <i>p</i> >0,70
Triplo (-) (4) vs Outros (40)	Outros	0,0412 _± 0,0413 - 0,0226 _± 0,0312	1,82	<i>t</i> = 0,937; <i>p</i> >0,30
Recidiva				
Sim (2) vs Não (37)	Não	0,0293 _± 0,0384 - 0,0481 _± 0,0634	1,64	<i>t</i> = 0,657; <i>p</i> >0,50
Metástase em sítios distantes				
Sim (7) vs Não (32)	Sim	0,0325 _± 0,0402 - 0,0203 _± 0,0337	1,60	<i>t</i> = 0,745; <i>p</i> >0,40
Óbito				
Sim (7) vs Não (34)	Sim	0,0361 _± 0,0415 - 0,0085 _± 0,0091	4,25	<i>t</i> = 1,725 < <i>t</i> _c = 2,440

FONTE: O Autor (2011).

NOTA: ¹ Atribuído valor 1,0 para referência. ² Valores de quantificação relativa demonstrando o quanto a média de expressão é maior que a classe referência.

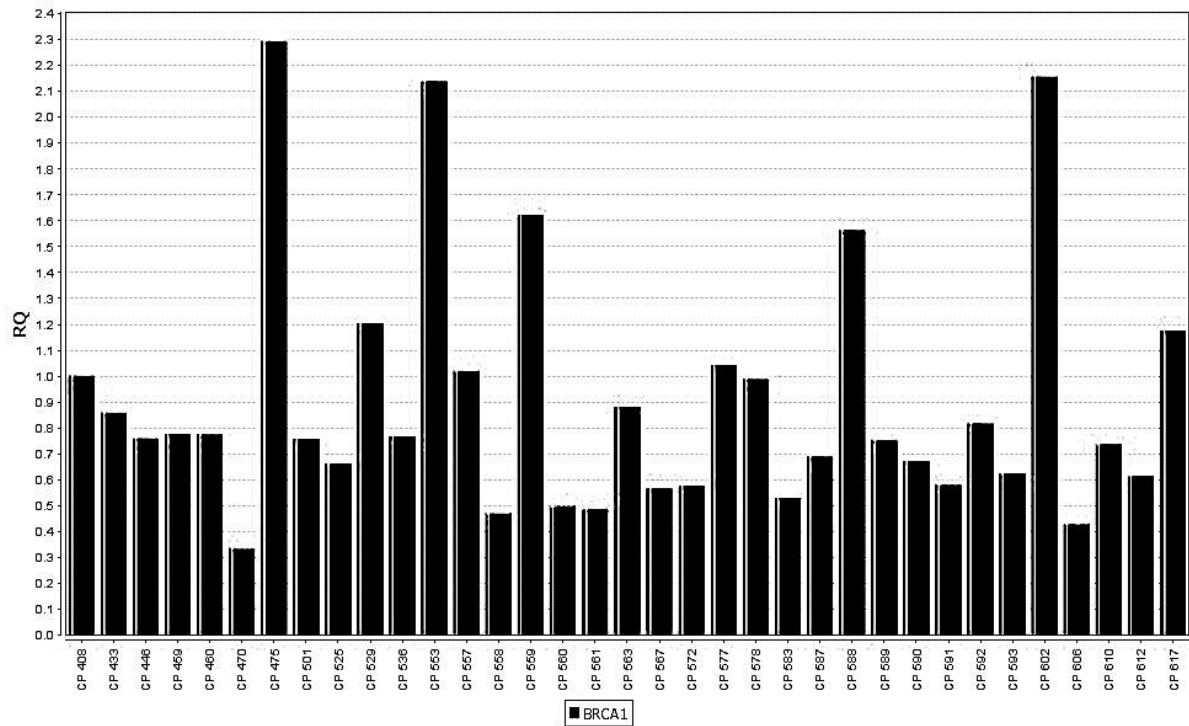


FIGURA 12 – VALORES DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA (RQ) DE *BRCA1*
 FONTE: Software DataAssist® (2011).

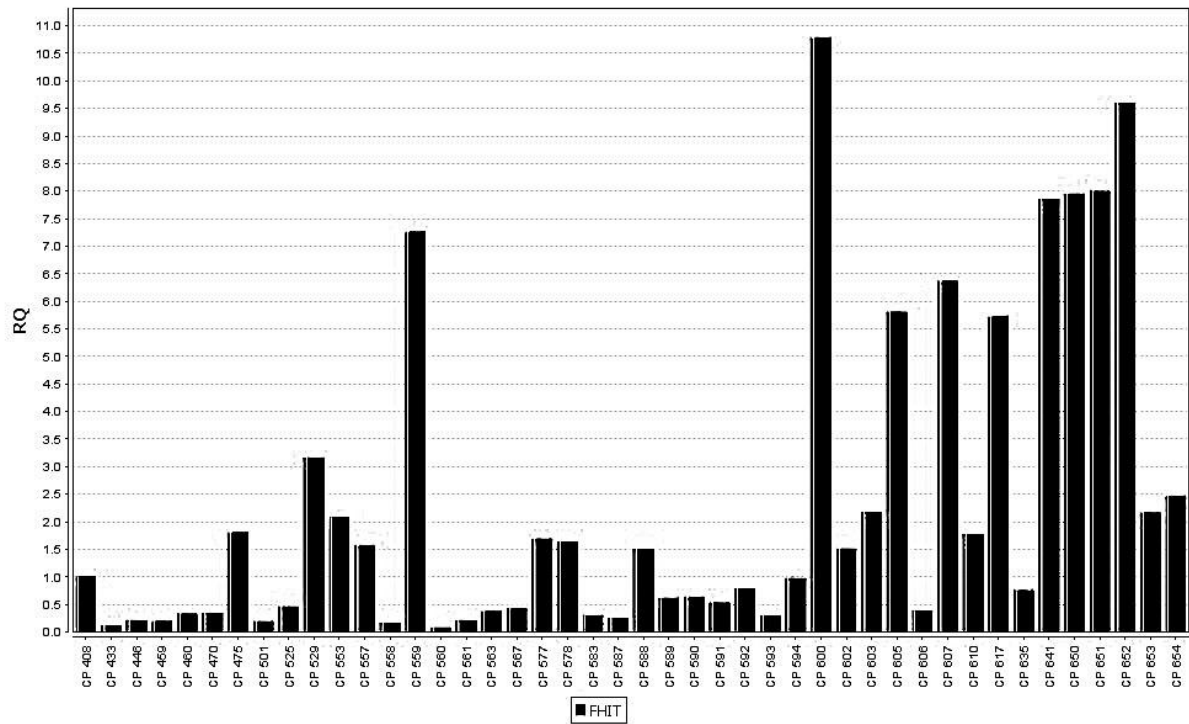


FIGURA 13 – VALORES DE QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA (RQ) DE *FHIT*
 FONTE: Software DataAssist® (2011).

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma designação geral para subtipos tumorais que podem diferir tanto no prognóstico como na resposta à terapia. A sua classificação na prática clínica é baseada na morfologia celular e na presença de vários receptores (principalmente os de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e a amplificação do oncogene *ERBB2*) e esta classificação mostrou-se útil na predição do prognóstico e no direcionamento do tratamento.

O perfil de expressão gênica, inicialmente descrito pelo grupo da Universidade de Stanford (PEROU *et al.*, 2000), tem demonstrado que a heterogeneidade morfológica do câncer de mama pode ser sistematicamente classificada em nível transcricional. Os estudos iniciais demonstraram que os perfis de expressão gênica mantêm uma variação sistemática que permite a classificação em cinco grupos distintos: dois grupos ER positivos referidos como Luminal (A e B), devido ao padrão de expressão similar ao das células epiteliais presentes na camada interna do ducto mamário; um grupo com amplificação do gene e expressão aumentada da proteína *ERBB2* (*ERBB2+*); um grupo com expressão semelhante à da célula normal com alta expressão de genes da camada basal e baixa expressão da luminal (*normal breast-like*) e, finalmente, um quinto grupo que foi previamente reconhecido como um subgrupo semelhante ao basal (*basal-like*). Este último foi caracterizado pela coloração positiva para as células mioepiteliais da camada basal, presença de citoqueratinas 5/6 e 17 e ausência dos receptores ER, PR e *ERBB2*. O termo “triplo negativo” (TN) se refere aos tumores que não expressam estes receptores (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; DIAZ *et al.*, 2007). Apesar da maioria dos tumores triplo-negativos apresentarem o padrão basal, não existe uma superposição completa entre os dois grupos, mas é bem reconhecido que compartilham uma série de características fenotípicas e moleculares com os tumores com mutações no gene *BRCA1*.

Mesmo com esta heterogeneidade conhecida, muitos avanços têm sido feitos na última década no cuidado dos pacientes portadores de cânceres mamários. Deste modo, terapias hormonais e o uso de trastuzumab para inibição da sinalização de *ERBB2* têm contribuído significativamente para o aumento da sobrevida. A heterogeneidade da resposta e da sensibilidade às drogas têm levado à pesquisa

contínua de uma segunda geração de marcadores moleculares, principalmente através do estudo da expressão gênica (TURAGA; ACS; LARONGA, 2010).

A expressão gênica é uma medida da atividade do gene, a qual é determinada pelo número de vezes que este é transcrito em mRNA e finalmente traduzido em uma proteína. Um perfil global da atividade gênica pode ser obtido através das análises com as tecnologias de microarranjo de DNA e qRT-PCR. Este perfil é chamado transcriptoma (TURAGA; ACS; LARONGA, 2010).

A análise dos perfis de transcrição de genes envolvidos em vias de sinalização, que atuam no controle do ciclo celular, é importante para a compreensão das interações entre estes genes. Através do mapeamento dessas interações será possível elucidar as causas da heterogeneidade dos tumores sólidos, como o câncer de mama (COWIN *et al.*, 2010).

Neste trabalho foram analisados 47 carcinomas mamários, a fim de determinar a expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT*. A quantificação da expressão gênica foi realizada através da quantificação relativa pelo Método do Cq Comparativo. A análise simultânea dos dois genes foi possível em 32 pacientes, a expressão do gene *FHIT* foi aproximadamente três vezes maior do que a do gene *BRCA1* (FIGURA 10), sendo a diferença estatisticamente significativa.

Os trabalhos iniciais que avaliaram a expressão de *BRCA1* utilizaram técnicas de silenciamento por oligonucleotídeos *antisense* (THOMPSON *et al.*, 1995) e também avaliaram a expressão da proteína BRCA1 através de imunohistoquímica (TAYLOR *et al.*, 1998; YOSHIKAWA *et al.*, 1999). As mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm uma grande implicação na Síndrome de Câncer de Mama Hereditário determinando um risco de 80-85% de desenvolver a doença em mulheres aos 80 anos de idade (EELES, 2000). Além disso, a expressão do gene *BRCA1* também está alterada em carcinomas esporádicos de mama. Isto resultou na avaliação da atuação do produto deste gene supressor de tumor na origem e progressão tumoral em casos de câncer de mama não hereditário (THOMPSON *et al.*, 1995; FRASER *et al.*, 2003; MUELLER; ROSKELLEY, 2003; ROLDÁN; DELGADO; MUSÉ, 2006; RAKHA *et al.*, 2008; GORSKI *et al.*, 2009; BOZHANOV *et al.*, 2010; DE SIERVI *et al.*, 2010; DI *et al.*, 2010; GILBERT *et al.*, 2010; MARGELI *et al.*, 2010; JOOSSE *et al.*, 2011).

Em aproximadamente 30% dos tumores esporádicos de mama a expressão de BRCA1 está diminuída, sem qualquer mutação aparente no gene (ROLDÁN;

DELGADO; MUSÉ, 2006). RAKHA *et al.* (2008), avaliaram 1940 casos de carcinoma invasivo de mama para a presença da proteína BRCA1 através de imunohistoquímica. A expressão nuclear uniforme foi observada no tecido mamário normal. A expressão alterada (expressão nuclear ausente ou reduzida - 15%; e expressão citoplasmática positiva - 36,6%) foi observada somente nos tecidos tumorais. Esta expressão alterada foi associada com alto grau tumoral, estágio avançado de acometimento de linfonodos axilares, tumores de maior tamanho, invasão vascular, receptores hormonais negativos, expressão positiva de TP53 e E-caderina e com a classe de tumores tipo basal, além de uma curta sobrevida livre da doença. Os autores ressaltaram que as características dos tumores estudados foram semelhantes às descritas na literatura para casos de cânceres familiares com mutações da linhagem germinativa de *BRCA1*, indicando a importância dessas alterações nos tumores esporádicos.

Joosse *et al.* (2011), avaliaram 41 pacientes portadoras de tumores esporádicos de mama tipo basal para a expressão de *BRCA1* por qRT-PCR, metilação do promotor de *BRCA1*, perfil genômico por CGH-array e expressão global por microarranjos de DNA. Metade dos tumores analisados apresentou deficiência na expressão de *BRCA1* e teve resultados semelhantes aos tumores com mutações no gene. As análises por qRT-PCR indicaram uma expressão baixa global e, na comparação das médias de expressão do gene entre os subtipos luminal e basal, este último apresentou expressão menor ($p < 0,0001$). Os autores sugerem que a perda da expressão de *BRCA1* pode determinar a instabilidade genômica com acúmulo de alterações citogenéticas e de danos no DNA, indicando um papel importante na progressão da doença.

Estudos iniciais descreveram transcritos anormais do gene *FHIT* em tumores de mama, pulmão, esôfago, estômago e cabeça e pescoço (SOZZI; HUEBNER; CROCE, 1998; CAMPIGLIO *et al.*, 1999; CAPUZZI *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2001; VAN HEERDEN, *et al.*, 2001). Outros trabalhos indicaram que a alta expressão de *FHIT* aumenta a sensibilidade do câncer pancreático à apoptose por indutores exógenos e a reintrodução de cópias deste gene em linhagens celulares de câncer de pulmão com baixa expressão de *FHIT*, reduz a proliferação celular (DUMON *et al.*, 2001; CAVAZZONI *et al.*, 2004).

Outros autores demonstraram que a expressão do gene *FHIT* está negativamente correlacionada com a progressão tumoral (TERRY *et al.*, 2007;

WANG *et al.*, 2008). Resultados de Ishii *et al.* (2006), sugerem que a expressão de *FHIT* é necessária para a proteção celular contra o acúmulo de danos ao longo dos pontos de checagem do ciclo celular, estando envolvida na modulação das proteínas Hus1 e Chk1 (proteínas reguladoras dos pontos de checagem).

A expressão reduzida do gene *FHIT* está presente em mais de 60% dos cânceres de mama, e em mais de 50% de regiões adjacentes aos tumores. Os níveis de expressão deste gene têm sido associados com importantes aspectos da gênese dos cânceres mamários, assim como com a resposta à quimioterapia e parâmetros histopatológicos (GULER *et al.*, 2009).

Guler *et al.* (2009), avaliaram a expressão de *FHIT* e *WWOX* (mapeado no sítio frágil FRA16D) em 837 pacientes através de imunohistoquímica em microarranjos de tecido (*tissue-arrays*) elaborados a partir de blocos de parafina. Também foram avaliadas a CK5/6 citoplasmática, EGFR, AP2 α e AP2 γ nucleares. Os tumores triplo-negativos tiveram perda da expressão destes genes ($p < 0,001$) e uma correlação negativa foi verificada entre a expressão de *FHIT* e *WWOX* e a expressão de EGFR, RE e RP ($p < 0,001$). A expressão de *FHIT* foi reduzida em tumores com amplificação de ERBB2 e AP2 γ positivos ($p < 0,001$ e $p < 0,002$, respectivamente). Os autores ressaltaram que a inativação de *FHIT* e *WWOX* pode ser um evento inicial na carcinogênese da mama e é frequente em tumores RE e RP negativos.

Esses resultados indicaram que a inativação dos genes nos sítios frágeis está fortemente associada entre si e pode ter uma importante função na formação dos tumores tipo basal. Os eventos moleculares envolvidos neste processo precisam ser investigados em experimentos *in vivo* para contribuir na identificação de novos alvos terapêuticos (GULER *et al.*, 2009).

Estudos das relações entre os cânceres mamários tipo basal e genes envolvidos na ativação da resposta ao dano no DNA (*DNA damage response* – DDR) em pontos de checagem têm sido descritos. Proteínas DDR de ponto de checagem estão ativadas em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em pele, pulmão e mama (GORGOULIS *et al.*, 2005; BARTKOVA *et al.*, 2005; BARTEK; BARTKOVA; LUKAS, 2007), funcionando como uma barreira à progressão tumoral. A quebra do DNA em FRA3B e/ou em outros sítios frágeis pode ser o evento que ativa a DDR e, paradoxalmente, a perda da expressão de *FHIT* altera o ponto de checagem, desde

que a proteína FHIT está envolvida na resposta normal ao dano no DNA, contribuindo para a progressão neoplásica (GULER *et al.*, 2010).

Em outro estudo, 459 pacientes portadoras de câncer de mama foram avaliadas para a expressão de diversas proteínas associadas à DDR (γ H2AX, BRCA1, Chk2 e TP53), proteínas supressoras tumorais sensíveis ao dano ao DNA (FHIT e WWOX) e proteínas de interação a WWOX (AP2 α e AP2 γ). A expressão das proteínas foi analisada através de imunohistoquímica com *tissue-arrays* obtidos de blocos de parafina. A análise multivariada indicou associação significativa entre os tumores triplo-negativos e a expressão reduzida de FHIT e WWOX ($p=0,002$ e $p=0,03$, respectivamente), e a expressão aumentada de TP53 e AP2 γ (ambos $p=0,004$). Os triplo-negativos foram o tipo mais comum a apresentar alteração na expressão de duas ou mais proteínas associadas ao DDR (GULER *et al.*, 2010).

De acordo com as nossas análises, ambos os genes mostraram baixa expressão, com Cq médio de $35,547 \pm 0,920$ para o gene *BRCA1* e $34,805 \pm 2,604$ para o gene *FHIT*. Porém, consideramos que um passo metodológico importante será a complementação com a análise de tecidos mamários não tumorais, pois a hipótese inicial de que as amostras com ROH nos forneceriam este parâmetro de “normalidade” não foi corroborada, por motivos que serão discutidos na sequência.

A expressão relativa dos genes *BRCA1* e *FHIT* observada em 32 pacientes foi comparada através do coeficiente de correlação de Pearson no presente estudo, e apresentou um valor de $r = 0,65$; $p > 0,0001$ (FIGURA 11), demonstrando uma interdependência entre as mesmas.

Estudos do nosso grupo de pesquisa têm avaliado a LOH nos locos dos genes *BRCA1* e *FHIT* em cânceres mamários, e têm demonstrado alta frequência de perda alélica concomitante nessas regiões. Estes resultados sugerem uma relação importante entre esses genes com implicações na gênese, progressão e evolução clínica da doença (CAVALLI *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2004; SILVA SOARES *et al.*, 2010).

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para justificar esta associação entre as alterações dos genes *BRCA1* e *FHIT*. Os estudos que avaliaram a expressão do gene *FHIT* em cânceres mamários familiares com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* apresentaram as primeiras evidências da relação entre alterações nestes genes. Ingvarsson *et al.* (1999), avaliaram carcinomas mamários esporádicos e

familiares para expressão dos genes *FHIT* e *BRCA2* (que é regulado em conjunto com o gene *BRCA1*). Os resultados destes autores demonstraram que a classe que possuía mutações em *BRCA2*, também apresentou uma baixa expressão do *FHIT*, indicando que alterações em *BRCA2* podem levar a instabilidade no loco *FHIT/FRA3B*. A instabilidade cromossômica é frequentemente observada em cânceres hereditários com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Nestes tumores a LOH e a expressão reduzida de *FHIT* são comumente observadas (INGVARSSON *et al.*, 2001; HUEBNER; CROCE, 2003).

Proteínas de reparo de mau pareamento pertencentes ao Complexo de Vigilância Genômica Associado a BRCA1 (*BRCA1-associated genome surveillance complex* - BASC) têm sido identificadas como o centro estrutural da maquinaria de resposta ao dano ao DNA. Todos os componentes conhecidos, incluindo BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1, ATM, ATR, BLM e o complexo trimérico MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), participam dos mecanismos moleculares de reparo do dano ao DNA, resposta transcricional, controle dos pontos de checagem e apoptose (SANCAR *et al.*, 2004; GUDMUNSDOTTIR; ASHWORTH, 2006). Os sítios frágeis FRA3B (*FHIT*) e FRA16D (*WWOX*) são sensíveis a alterações nos mecanismos de controle dos pontos de checagem e de reparo. Deleções nestes sítios frágeis devido ao funcionamento incorreto do processo de reparo têm sido descritas (ISHII *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que a via do *BRCA1* é importante na proteção ao dano do loco FRA3B(*FHIT*) e a inativação desta via contribui para perda da expressão de *FHIT* nestes tumores (PICHIORRI *et al.*, 2008; OKUMURA *et al.*, 2009).

Desta forma, a correlação verificada entre a expressão destes genes no presente estudo está de acordo com dados da literatura e sugere que alterações no gene *BRCA1*, como eventos iniciais no processo tumorigênico, estão relacionadas com a expressão do gene *FHIT*. A instabilidade genômica resultante do descontrole da via de reparo BASC pode ser indicada como a causa desta correlação.

Contudo, ainda não se conhece completamente todas as interações em que estes genes estão envolvidos. Como o produto do gene *FHIT* não apresenta nenhum domínio ou motivo proteico de ligação a outras proteínas que possa fornecer uma indicação de suas possíveis interações, o seu estudo tem sido um grande desafio. Embora sua importância em vias de controle do ciclo celular e da regulação do processo de apoptose seja conhecida. A proteína FHIT estabiliza a

CHK1 e CICLINA D1, além de fazer possíveis interações com UBC9, tubulina, Mdm2 e beta-caderina (OKUMURA *et al.*, 2009).

Embora a proteína BRCA1 tenha interações melhor mapeadas (FIGURA 1) do que a FHIT, novos mecanismos de regulação têm sido descritos. Recentemente, autores descreveram um mecanismo de autorregulação transcricional de *BRCA1*, juntamente com as proteínas E2F e RB. Estes elementos formam um complexo que atua sobre o promotor de *BRCA1*, impedindo sua expressão. Estresse genotóxico pode desestabilizar este complexo e permitir a expressão de BRCA1. Este novo mecanismo de autorregulação está envolvido diretamente com a manutenção da estabilidade genômica em células expostas a estresse genotóxico (DE SIERVI *et al.*, 2010). Portanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar as interações dos produtos destes genes e sua importância para a heterogeneidade tumoral nos diversos subtipos de câncer de mama.

As comparações entre as médias de expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* e as classes baseadas na presença ou ausência de LOH não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (TABELA 4). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar este fato: 1) regulação epigenética de promotores, 2) regulação através de fatores proteicos e, 3) contaminação da amostra.

Diversos trabalhos têm demonstrado que tanto o gene *BRCA1* como o *FHIT* podem apresentar regulação através de metilação (YOSHIKAWA *et al.*, 1999; BALDWIN *et al.*, 2000; MAGDINIER *et al.*, 2000; RICE; FUTSCHER, 2000; ZÖCHBAUER-MÜLLER *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001b; CHAN *et al.*, 2002; MUELLER; ROSKELLEY, 2003; ROSEN *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2005; HONRADO *et al.*, 2007; MIRZA *et al.*, 2007; KI *et al.*, 2008, RAISH *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; SYEED *et al.*, 2010).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a perda da expressão de genes supressores de tumor, como a hipermetilação e mutações somáticas (TAPIA *et al.*, 2008). A metilação de promotores foi a primeira alteração epigenética encontrada no genoma humano, e possivelmente apresenta uma importante função na tumorigênese. Estudos têm mostrado que a hipermetilação de promotores ricos em regiões CpG e exons, está fortemente associada com o silenciamento transcricional, e que as ilhas CpG apresentam-se mais metiladas em tecidos tumorais do que regiões sem ilhas CpG. Além disso, a hipermetilação em ilhas CpG em regiões de regulação de transcrição são conhecidas por induzir

inativações epigenéticas de genes supressores de tumor durante a progressão tumoral (EHLICH *et al.*, 2002). A metilação de ilhas 5'-CpG têm sido descrita em carcinomas de próstata, mama, cervix, esôfago e pulmão (KI *et al.*, 2008).

Tapia *et al.*, (2008), avaliaram 49 biopsias de carcinomas mamários, previamente genotipados para mutações em *BRCA1* ou *BRCA2*, para a presença ou ausência de metilação no promotor de *BRCA1*, com o objetivo de analisar a função desta alteração epigenética em tumores mamários hereditários. Também foi realizada análise através de imunohistoquímica da expressão da proteína BRCA1. A metilação do promotor do *BRCA1* foi encontrada em 51% dos carcinomas, e destes, 67% não apresentaram expressão do produto proteico. Estes resultados sugerem que a hipermetilação pode ser considerada um mecanismo de inativação da expressão de BRCA1, tanto em tumores hereditários como em tumores esporádicos do tipo basal, que apresentam perfis de expressão semelhantes aos hereditários.

Syeed *et al.* (2010), estudaram 130 pacientes portadoras de câncer de mama esporádico através de sequenciamento e PCR específica para análise de metilação do gene *FHIT*. Mutações no gene *FHIT* foram encontradas em 40,8% (n=53) das pacientes estudadas e a hipermetilação foi encontrada em 45,4% (n=59) pacientes. Trinta pacientes apresentaram mutação e hipermetilação simultaneamente, corroborando a hipótese dos dois eventos para inativação de genes supressores de tumores e mostrando que a alteração epigenética pode ser considerada um dos eventos.

Outros estudos têm sugerido que os mecanismos de regulação da transcrição através da modulação dos promotores podem estar alterados em tumores de mama esporádicos (ROSEN *et al.*, 2003).

Várias proteínas sequencia-específicas de ligação ao DNA têm sido identificadas como potentes reguladores do promotor de *BRCA1*, incluindo a proteína de ligação GA (GABP α/β – um fator de transcrição que interage com regiões ricas em GA) e BRN-3B pertencente à família de fatores de transcrição POU, que faz a regulação negativa de *BRCA1* em células mamárias tumorais, mostrando expressão inversamente relacionada à expressão de *BRCA1* em cânceres mamários (ROSEN *et al.*, 2003). Macdonald, Stramwasser e Mueller (2007), caracterizaram um elemento de regulação a jusante do gene *BRCA1* que foi denominado de sítio UP (*upstream*) através de experimentos de transfecção entre as linhagens neoplásicas humanas MCF-7 e T47-D. Através da inibição deste elemento a expressão do gene

foi aumentada, sugerindo que o elemento UP seja um regulador negativo. Dois sítios de ligação são verificados nesta nova sequência, um deles para a GABP α/β . Segundo os autores, a identificação deste elemento repressor do promotor de *BRCA1* sugere um novo nível de complexidade para a regulação da expressão deste gene. Este elemento pode desempenhar uma função de integração de outros sinais, incluindo duas diferentes vias de crescimento celular, e é possível que a perda da habilidade de repressão do promotor de *BRCA1* durante estágios críticos do ciclo celular contribua para a carcinogênese mamária.

O processo de autorregulação já descrito acrescenta novas possibilidades de interações que também podem apresentar problemas, levando à desregulação do gene *BRCA1* sem que ocorram perdas alélicas detectáveis por métodos como a pesquisa de LOH (DE SIERVI *et al.*, 2010).

No presente estudo, o esperado seria encontrarmos a expressão normal em pacientes com ROH e diminuída naqueles com LOH, porém a maioria das pacientes que possuía ROH apresentou expressão abaixo da média observada para os genes *BRCA1* (63,6%, n=7/11) e *FHIT* (73,3%, n=22/30). Uma vez que a desestabilização da regulação epigenética ou da regulação proteica dos promotores não são detectadas pela análise de LOH, mas têm implicações diretas sobre a expressão gênica no nível de RNA, podemos levantar a hipótese de que alterações epigenéticas, e não as perdas alélicas, sejam responsáveis pela diminuição do nível de expressão gênica. Estudos complementares do *status* de metilação dos promotores dos genes *BRCA1* e *FHIT* podem contribuir para elucidar estas questões.

Entre as pacientes que apresentaram LOH para o gene *BRCA1*, 37,5% (n=3/8) apresentaram expressão maior do que a média, e para o gene *FHIT*, 21,4% (n=3/14). Apesar do número reduzido, estas pacientes causaram uma distorção na análise comparativa entre a expressão dos genes e a presença ou ausência de LOH. A contaminação das amostras tumorais através de células do tecido adjacente não tumoral é uma possível explicação para este dado. Esta é uma dificuldade conhecida nas análises de LOH em tecidos tumorais frescos, quando as amostras não são microdissectadas (TOMLINSON; LAMBROS; ROYLANCE, 2002). A presença de células não tumorais pode aumentar o número de cópias de mRNA para os genes analisados levando a falsas leituras de expressão aumentada em pacientes que apresentam perda alélica do gene. Uma possível solução para este

problema é a utilização de amostras microdissectadas, de preferência em sistemas de captura a laser (LCM), com o auxílio de médico patologista.

De maneira geral, os parâmetros histopatológicos avaliados (grau histológico, tamanho tumoral, presença ou ausência de linfonodos metastáticos, RE, RP e amplificação de ERBB2) e de evolução clínica (recidiva, metástase e óbito) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as médias de expressão para os genes *BRCA1* e *FHIT* (TABELAS 5 e 6).

Hayashi *et al.* (1997), descreveram transcritos anormais do gene *FHIT* em 61 tumores de mama e não encontraram associação entre os transcritos anormais e os parâmetros idade, tamanho tumoral, estado linfonodal, potencial recorrência local, histórico familiar e estilo de vida. Em outro estudo, que descreveu a perda de expressão de *FHIT* em 72% dos casos de câncer de mama analisados (n=50), nenhuma associação foi encontrada com idade, grau e tamanho tumoral, e histórico familiar (GATALICA *et al.*, 2000). Santos *et al.* (2004), não encontraram relação entre a frequência de LOH em *BRCA1* e *FHIT* em carcinomas mamários esporádicos e parâmetros histopatológicos (tamanho tumoral, grau histológico e presença ou ausência de linfonodos metastáticos). Entretanto, os autores sugerem que estudos com maior número amostral devem ser realizados para confirmar estes resultados.

Margeli *et al.* (2010), estudaram 86 pacientes com câncer de mama que passaram por regime de quimioterapia neoadjuvante (fluoracil, epirubicin e ciclofosfamida). Destes, 41 foram avaliados através de qRT-PCR para expressão de *BRCA1* e não apresentaram diferenças significantes entre os níveis de expressão e os parâmetros histopatológicos analisados. Entretanto, os autores ressaltam que estes dados devem ser interpretados com cautela devido ao reduzido tamanho amostral.

Apesar dos autores acima citados e como já bastante explicitado ao longo deste trabalho, são várias e bem aceitas as evidências de que a ausência ou a diminuição da expressão dos genes *FHIT* e *BRCA1* se correlacionam com os parâmetros de pior prognóstico. O que podemos verificar como um fator comum entre os diversos estudos é a limitação do tamanho amostral que diminui o poder estatístico nos diferentes estudos, inclusive no nosso.

A única exceção em relação à significância estatística foi a classe com ausência de linfonodos metastáticos que apresentou a média de expressão de *BRCA1* maior (RQ=1,52) ($t'=2,33 > t_c=2,13$) do que a da classe com presença de

linfonodos metastáticos. A média da classe de ausência de linfonodos metastáticos também foi a maior entre as avaliadas neste estudo para o gene *BRCA1* ($0,0123 \pm 0,0071$) (TABELA 5).

Estes resultados corroboram os dados da literatura que sugerem que alterações no gene *BRCA1* estão relacionadas com parâmetros de pior prognóstico e baixa sobrevida em pacientes portadoras de cânceres esporádicos mamários. Amirrad *et al.* (2005), avaliaram 48 pacientes portadoras de câncer de mama através de imunohistoquímica e RT-PCR para a expressão da proteína e mRNA do gene *BRCA1* e parâmetros de prognóstico. Uma relação significativa foi observada entre a expressão reduzida de *BRCA1* (mRNA e proteína) e elevado grau histológico, RE e PR negativos, e superexpressão de ERBB2. Outros trabalhos também observaram associações positivas entre parâmetros histopatológicos e/ou prognósticos e a expressão do gene *BRCA1* em tumores mamários (ROLDÁN, DELGADO; MUSÉ, 2006; RAKHA *et al.*, 2008; BOZHANOV *et al.*, 2010, BURKADZE *et al.*, 2010). Dentre estes trabalhos, Rakha *et al.* (2008), verificaram associação significativa entre a expressão nuclear ausente ou reduzida de *BRCA1* e linfonodos em estágio avançado ($p < 0,007$).

A relação entre as médias de baixa expressão do gene *BRCA1* e a presença de linfonodos metastáticos no presente estudo corrobora os dados apresentados acima e sugere que a perda da expressão deste gene é um evento importante para os mecanismos de progressão e invasão no câncer de mama esporádico.

De forma geral, é provável que a metodologia utilizada neste estudo, de avaliar as diferenças entre as médias de expressão gênica geradas pela qRT-PCR, seja um procedimento que resulta em informações com menor poder de resolução estatística que, tanto na literatura como neste trabalho, se alia ao pequeno tamanho das amostras. Assim, as implicações biológicas sobre a ação conjunta dos genes *BRCA1* e *FHIT* na carcinogênese mamária, devem ser mais efetivamente avaliadas pela análise simultânea de duas ou mais variáveis, como nos permite a regressão e a correlação. Utilizando a análise de correlação, os dados do presente estudo demonstraram que a expressão destes genes está positivamente correlacionada, o que, conforme descrito na literatura sugere uma função central e conjunta na regulação do reparo do dano ao DNA e de apoptose. Ainda, a baixa expressão do gene *BRCA1* verificada em tumores com presença de linfonodos metastáticos sugere a participação deste gene supressor tumoral no potencial invasivo dos

cânceres esporádicos mamários. Estudos com maior tamanho amostral e utilizando outras abordagens metodológicas poderão confirmar estes resultados.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, a quantificação relativa da expressão dos genes *BRCA1* e *FHIT* foi avaliada em tumores esporádicos mamários através de qRT-PCR e apresentou correlação significativa. Estes dados indicam uma relação direta entre os genes e, conforme descrito na literatura, uma importante função no processo de gênese e progressão tumoral.

As comparações entre as médias de expressão destes genes e as classes de presença ou ausência de LOH não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A regulação epigenética e/ou de fatores proteicos sobre os promotores e, a provável contaminação com células não tumorais adjacentes, podem ter sido responsáveis pela ausência de relação direta entre a presença ou ausência de LOH e baixa ou alta expressão de *BRCA1* e *FHIT*.

De maneira geral, as comparações entre as médias de expressão dos genes, os parâmetros histopatológicos e de evolução clínica, não apresentaram diferenças significativas, exceto para a comparação entre as médias de expressão do gene *BRCA1* nas classes de ausência e presença de linfonodo metastático, na qual se observou média de expressão significativamente maior na classe de ausência de linfonodo metastático. O baixo número amostral, em especial quando a amostra foi subdividida, pode ter sido responsável pela não significância das observações.

REFERÊNCIAS

AHMADIAN, M.; WISTUBA, I. I.; FONG, K. M.; BEHRENS, C.; KODAGODA, D. R.; SABOORIAN, M. H.; SHAY, J.; TOMLINSON, G. E.; BLUM, J.; MINNA, J. D.; GAZDAR, A. F. Analysis of the *FHIT* gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer Res.**, v. 57, p. 3664-3668, 1997.

AMIRRAD, M.; AL-MULLA, F.; VARADHARAJ, G.; JOHN, B.; SAJI, T.; ANIM, J. T. *BRCA1* gene expression in breast cancer in Kuwait: correlation with prognostic parameters. **Med. Princ. Pract.**, v. 14, p. 67-72, 2005.

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

ARUN, B.; KILIC, G.; YEN, C.; FOSTER, B.; YARDLEY, D. A.; GAYNOR, R.; ASHFAQ, R. Loss of FHIT Expression in Breast Cancer Is Correlated with Poor Prognostic Markers. **Cancer Epidem. Biomar.**, v. 7, p 1681-1685, 2005.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mut. Res.**, n. 464, p. 65-76, 2000.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.

BALDWIN, R. L.; NEMETH, E.; TRAN, H.; SHVARTSMAN, H.; CASS, I.; NAROD, S.; KARLAN, B. Y. *BRCA1* promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: A population-based study. **Cancer Res.**, v. 60, p. 5329– 5333, 2000.

BARTEK, J.; BARTKOVA, J.; LUKAS, J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. **Oncogene**, v. 26, p. 7773-7779, 2007.

BARTKOVA, J.; HOREJSÍ, Z.; KOED, K.; KRÄMER, A.; TORT, F.; ZIEGER, K.; GULDBERG, P.; SEHESTED, M.; NESLAND, J. M.; LUKAS, C.; ØRNTOFT, T.; LUKAS, J.; BARTEK, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, p. 864-870, 2005.

BERRY, D. A.; CRONIN, K. A.; PLEVITIS, S. K.; FRYBACK, D. G.; CLARKE, L.; ZELLEN, M.; MANDELBLATT, J. S.; YAKOVLEV, A. Y.; HABBEMA, J. D. F.; FEUER, E. J. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1784-1792, 2005.

BIANCHI, F.; TAGLIABUE, E.; MÉNARD, S.; CAMPIGLIO, M. *Fhit* expression protects against HER2-driven breast tumor development: unraveling the molecular interconnections. **Cell Cycle**, v. 6, p. 643-646, 2007.

BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In Charron, D. HLA – Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. Paris; EDK, 1997.

BISHOP, J. M. Viral Oncogenes. **Cell.**, v. 42, p. 23-38, 1985.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, v. 235, p. 305-311, 1987.

BOZHANOV, S. S.; ANGELOVA, S. G.; KRASTEVA, M. E.; MARKOV, T. L.; CHRISTOVA, S. L.; GAVRILOV, I. G.; GEORGIEVA, E. I. Alterations in *p53*, *BRCA1*, *ATM*, *PIK3CA*, and *HER2* genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 36, p. 1657-1669, 2010.

BURKADZE, G.; KHANDZEISHVILI, O.; GUDADZE, M.; TSIKHISELI, G.; TURASHVILI, G. Immunohistochemical expression of BRCA1 protein in invasive ductal carcinoma of the breast. **Georgian Med. News**, v. 184-185, p. 51-60, 2010.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDERSOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimal Information of Publication of Quantitative Real-Time Experiments. **Clin. Chem.**, v. 55, p. 611-622, 2009.

CAMPIGLIO, M.; PEKARSKY, Y.; MENARD, S.; TAGLIABUE, E.; PILOTTI, S.; CROCE, C. M. *FHIT* loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3866-3869, 1999.

CAPUZZI, D.; SANTORO, E.; HAUCK, W. W.; KOVATICH, A. J.; ROSATO, F. E.; BAFFA, R.; HUEBNER, K.; MCCUE, P. A. Fhit expression in gastric adenocarcinoma: correlation with disease stage and survival. **Cancer**, v. 88, p. 24-34, 2000.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exptl. Cell Res.**, v. 60, p. 315-319, 1970a.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. *et al.* Identification of human chromosome by DNA-binding fluorescent agent. **Chromosoma**, v. 60, p. 215-227, 1970b.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X. **Exptl. Cell Res.**, v. 61, p. 474-476, 1970c.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Exptl. Cell Res.**, v. 62, p. 490-492, 1970d.

CAVALLI, L. R.; SINGH, B.; ISAACS, C.; DICKSON, R. B.; HADDAD, BASSEM. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in *BRCA1/2* carriers with breast cancer. **Cancer Genet. Cytogen.**, v. 149, p. 38-43, 2004.

CAVAZZONI, A.; PETRONINI, P. G.; GALETTI, M.; ROZ, L.; ANDRIANI, F.; CARBOGNANI, P.; RUSCA, M.; FUMAROLA, C.; ALFIERI, R.; SOZZI, G. Dose-dependent effect of Fhit-inducible expression in Calu-1 lung cancer cell line. **Oncogene**. v. 23, p. 8439-8446, 2004.

CHAN, K. Y.; OZCELIK, H.; CHEUNG, A. N.; NGAN, H. Y.; KHOO, U. S. Epigenetic factors controlling the *BRCA1* and *BRCA2* genes in sporadic ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 62, p. 4151-4156, 2002.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncol.**, v. 8, p. 235-244, 2007.

COLLINS, J. A.; BLAKE, J. M.; CROSIGNANI, P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Hum. Reprod. Update**, v. 11, p. 545-560, 2005.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. Boston: **Jones and Bartlett Publishers**, 1994.

COUGHLIN, S. S.; EKWUEME, D. U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiol.**, v. 33, p. 315-318, 2009.

COWIN, P. A.; ANGLÉSIO, M.; ETEMADMOGHADAM, D.; BOWTELL, D. D. Profiling the cancer genome. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 11, p.133-59, 2010.

DAWLING, S.; HACHEY, D. L.; ROODI, N.; PARL, F. F. In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 17, p. 1258-1264, 2004.

DE SIERVI, A.; DE LUCA, P.; BYUN, J. S.; DI, L. J.; FUFU, T.; HAGGERTY, C. M.; VAZQUEZ, E.; MOIOLA, C.; LONGO, D. L.; GARDNER, K. Transcriptional autoregulation by *BRCA1*. **Cancer Res.**, v. 70, p. 532-542, 2010.

DI, L. J.; FERNANDEZ, A. G.; DE SIERVI, A.; LONGO, D. L.; GARDNER, K. Transcriptional regulation of *BRCA1* expression by a metabolic switch. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, p. 1406-1413, 2010.

DIAZ, L. K.; CRYNS, V. L.; SYMMANS, W. F.; SNEIGE, N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profile to clinical practice. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 14, p. 419-430, 2007.

DUMON, K. R.; ISHII, H.; VECCHIONE, A.; TRAPASSO, F.; BALDASSARRE, G.; CHAKRANI, F.; DRUCK, T.; ROSATO, E. F.; WILLIAMS, N. N.; BAFFA, R.; DURING, M. J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 4827-4836, 2001.

EELES, R. A. Future possibilities in the prevention of breast cancer Intervention strategies in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Breast Cancer Res.**, v. 2, p. 283–290, 2000.

EHRlich, M.; JIANG, G.; FIALA, E.; DOME, J. S.; YU, M. C.; LONG, T. I.; YOUN, B.; SOHN, O. S.; WIDSCHWENDTER, M.; TOMLINSON, G. E.; CHINTAGUMPALA, M.; CHAMPAGNE, M.; PARHAM, D.; LIANG, G.; MALIK, K.; LAIRD, P. W. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. **Oncogene**, v. 21, p. 6694-6702, 2002.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FRASER, J. A.; REEVES, J. R.; STANTON, P. D.; BLACK, D. M.; GOING, J. J.; COOKE, T. G.; BARTLETT, J. M. S. A role for *BRCA1* in sporadic breast cancer. **Brit. J. Cancer**, v. 88, p. 1263 – 1270, 2003.

GARNIS, C.; BUYS, T. P. H.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol. Cancer**, v. 22, p. 3-9, 2004.

GATALICA, Z.; LELE, S. M.; RAMPY, B. A.; NORRIS, B. A. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1378– 1383, 2000.

GILBERT, P. M.; MOUW, J. K.; UNGER, M. A.; LAKINS, J. N.; GBEGNON, M. K.; CLEMMER, V. B.; BENEZRA, M.; LICHT, J. D.; BOUDREAU, N. J.; TSAI, K. K.; WELM, A. L.; FELDMAN, M. D.; WEBER, B. L.; WEAVER, V. M. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 1535-1550, 2010.

GINESTIER, C.; BARDOU, V. J.; POPOVICI, C.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; BERTUCCI, F.; GENEIX, J.; ADELAIDE, J.; CHAFFANET, M.; HASSOUN, J.; VIENS, P.; JACQUEMIER, J.; BIRNBAUM, D. Loss of fhit protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer. **Int. J. Cancer**, v. 107, p. 854 –862, 2003.

GINZINGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hematol.**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GORDON, H. Oncogenes. **Mayo Clin. Proc.**, v. 60, p. 697-713, 1985.

GORGOULIS, V. G.; VASSILIOU, L. V.; KARAKAIDOS, P.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; LILOGLOU, T.; VENERE, M.; DITULLIO, R. A.; KASTRINAKIS, N. G.; LEVY, B.; KLETSAS, D.; YONETA, A.; HERLYN, M.; KITTAS, C.; HALAZONETIS, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, p. 907-913, 2005.

GORSKI, J. J.; JAMES, C. R.; QUINN, J. E.; STEWART, G. E.; STAUNTON, K. C.; BUCKLEY, N. E.; MCDYER, F. A.; KENNEDY, R. D.; WILSON, R. H.; MULLAN, P. B.; HARKIN, D. P. *BRCA1* transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.122, p. 721-731, 2009.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.**, v. 274, p. 80-85, 1995.

GUDMUNDSDOTTIR, K.; ASHWORTH, A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. **Oncogene**, v. 25, p. 5864-5874, 2006.

GULER, G.; UNER, A.; GULER, N.; HAN, S.; ILIOPOULOS, D.; MCCUE, P.; HUEBNER, K. Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. **Pathol. Int.**, v. 55, p. 471–478, 2005.

GULER, G.; HUEBNER, K.; HIMMETOGLU, C.; JIMENEZ, R. E.; COSTINEAN, S.; VOLINIA, S.; PILARSKI, R. T.; HAYRAN, M.; SHAPIRO, C. L. Fragile Histidine Triad Protein, WW Domain-containing Oxidoreductase Protein Wwox, and Activator Protein 2c Expression Levels Correlate With Basal Phenotype in Breast Cancer. **Cancer**, v. 15, p. 899-908, 2009.

GULER, G.; HIMMETOGLU, C.; JIMENEZ, R. E.; GEYER, S. M.; WANG, W. P.; COSTINEAN, S.; PILARSKI, R. T.; MORRISON, C.; SUREN, D.; LIU, J.; CHEN, J.; KAMAL, J.; SHAPIRO, C. L.; HUEBNER, K. Aberrant expression of DNA damage response proteins is associated with breast cancer subtype and clinical features. **Breast Cancer Res. Treat.**, epub 2010.

HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J. E.; ANDERSON, L. A.; HUEY, B.; KING, M. C.; Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, p. 1684-1689, 1990.

HAYASHI, S.; TANIMOTO, K.; HAJIRO-NAKANISHI, K.; TSUCHIYA, E.; KUROSUMI, M.; HIGASHI, Y.; IMAI, K.; SUGA, K.; NAKACHI, K. Abnormal *FHIT* transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1981–1985, 1997.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-374, 2001.

HOFMANN, W.; SCHLAG, P. M. *BRCA1* and *BRCA2* – breast cancer susceptibility genes. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 126, p. 487-496, 2000.

HONRADO, E.; OSORIO, A.; MILNE, R.; PAZ, M.; MELCHOR, L.; CASCÓN, A.; URIOSTE, M.; CAZORLA, A.; DÍEZ, O.; LERMA, E.; ESTELLER, M.; PALACIOS, J.; BENÍTEZ, J. Immunohistochemical classification of non-*BRCA1/2* tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of *BRCAX* families. **Mod. Pathol.**, v. 12, p. 1298-1306, 2007.

HUEBNER, K.; GARRISON, P. N.; BARNES, L. D. The role of the *FHIT/FRA3B* locus in cancer. **Annu. Rev. Gen.**, v. 32, p. 7–31, 1998.

HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Cancer and the *FRA3B/FHIT* fragile locus: it's a *HIT*. **Brit. J. Cancer**, v. 88, p. 1501-1505, 2003.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (disponível em <http://www.inca.gov.br>), 2008.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Perfil da Incidência. Rio de Janeiro (disponível em <http://www.inca.gov.br>), 2010.

INGVARSSON, S.; AGNARSSON, B. A.; SIGBJORNSDOTTIR, B. I.; KONONEN, J.; KALLIONIEMI, O.; BARKARDOTTIR, R. B.; KOVATICH, A. J.; SCHWARTING, R.; HAUCK, W. W.; HUEBNER, K.; MCCUE, P. A. Reduced *Fhit* Expression in Sporadic and *BRCA2*-linked Breast Carcinomas. **Cancer Res.**, v. 59, p. 2682-2689, 1999.

INGVARSSON, S. *FHIT* alterations in breast cancer. **Cancer Biol.**, v. 11, p. 361-366, 2001.

ISHII, H.; DUMON, K. R.; VECCHIONE, A.; TRAPASSO, F.; MIMORI, K.; ALDER, H.; MORI, M.; SOZZI, G.; BAFFA, R.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. . Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1578-1584, 2001.

ISHII, H.; MIMORI, K.; INOUE, H.; INAGETA, T.; ISHIKAWA, K.; SEMBA, S.; DRUCK, T.; TRAPASSO, F.; TANI, K.; VECCHIONE, A.; CROCE, C. M.; MORI, M.; HUEBNER, K. Fhit modulates the DNA damage checkpoint response. **Cancer Res.**, v. 23, p. 11287-11292, 2006.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics 2010. **Cancer J. Clin.**, v. 60, p. 1-24, 2010.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D.; Cancer Statistics 2011. **Cancer J. Clin.**, *in press*, 2011.

JI, L.; FANG, B.; YEN, N.; FONG, K.; MINNA, J. D.; ROTH, J. A. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (*FHIT*) gene overexpression. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3333-3339, 1999.

JOOSSE, S. A.; BRANDWIJK, K. I.; MULDER, L.; WESSELING, J.; HANNEMANN, J.; NEDERLOF, P. M. Genomic signature of *BRCA1* deficiency in sporadic basal-like breast tumors. **Gene. Chromosome Can.**, v. 50, p.71-81, 2011.

KI, K. D.; LEE, S. K.; TONG, S. Y.; LEE, J. M.; SONG, D. H.; CHI, S. G. Role of 5'-CpG island hypermethylation of the *FHIT* gene in cervical carcinoma. **J. Gynecol. Oncol.**, v. 17, p. 117-122, 2008.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 68, p. 820-823, 1971.

LEE, W. Y.; JIN, Y. T.; CHANG, T. W.; LIN, P. W.; SU, I. J. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. **Histopathology**, v. 34, p. 106-112, 1999.

LEE, J. S.; FACKLER, M. J.; LEE, J. H.; CHOI, C.; PARK, M. H.; YOON, J. H.; ZHANG, Z.; SUKUMAR, S. Basal-like breast cancer displays distinct patterns of promoter methylation. **Cancer Biol. Ther.**, v. 12, p. 1017-1024, 2010.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, p. 643-649, 1998.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 40-54, 2000.

LIEHR, J. G.; ROY, D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. **Free Radical Biol. Med.**, v. 8, p. 415-423, 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACDONALD, G.; STRAMWASSER, M.; MUELLER, C. R. Characterization of a negative transcriptional element in the *BRCA1* promoter. **Breast Cancer Res.**, v. 9, p. 1-12, 2007.

MAGDINIER, F.; BILLARD, L. M.; WITTMANN, G.; FRAPPART, L.; BENCHAI, M.; LENOIR, G. M.; GUERIN, J. F.; DANTE, R. Regional methylation of the 50 end CpG island of *BRCA1* is associated with reduced gene expression in human somatic cells. **FASEB J.**, v. 14, p. 1585–1594, 2000.

MAN, S.; ELLIS, I. O.; SIBBERING, M.; BLARNEY, R. W.; BROOK, J. D.; High levels of allele loss at the FHIT and ATM genes in non-comedo ductal cancer in situ and grade I tubular invasive breast cancer. **Cancer Res.**, v. 56, p. 5484–5489, 1996.

MARGELI, M.; CIRAUQUI, B.; CASTELLA, E.; TAPIA, G.; COSTA, C.; GIMENEZ-CAPITAN, A.; BARNADAS, A.; SANCHEZ RONCO, M.; BENLLOCH, S.; TARON, M.; ROSELL, R. The prognostic value of *BRCA1* mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **PLoS One**, v. 5, p. e9499, 2010.

MIKI, Y.; SWENSEM, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; HARSHMAN, H.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L. M.; DING, W. A strong candidate for a breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, p. 66-71, 1994.

MIRZA, S.; SHARMA, G.; PRASAD, C.; PARSHAD, R.; SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.; RALHAN, R. Promoter hypermethylation of *TMS1*, *BRCA1*, *ERalpha* and *PRB* in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. **Life Sci.**, v. 81, p. 280-287, 2007.

MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. **Mutat. Res.**, v. 462, p. 247-253, 2000.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 9-41, 2003.

MORI, M.; MIMORI, K.; MASUDA, T.; YOSHINAGA, K.; YAMASHITA, K.; MATSUYAMA, A.; INOUE, H. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the *FHIT* locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. **Cancer Res.**, v. 61, p. 7379-7382, 2001.

MUELLER, R. C.; ROSKELLEY, C. D. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 5, p.45-52, 2003.

MURRAY, M. M.; MULLAN, P. B.; HARKIN, D. P. Role played by BRCA1 in transcriptional regulation in response to therapy. **Biochem. Soc. T.**, v. 5, p. 1342-1347, 2007.

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

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson; Thompson Genetics in Medicine**, 6 ed. W.B. Saunders Company, 2001.

OHTA, M.; INOUE, H.; COTTICELLI, M. G.; KASTURY, K.; BAFFA, R.; PALAZZO, J.; SIPRASHVILI, Z.; MORI, M.; MCCUE, P.; DRUCK, T.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, v.84, p. 587-597, 1996.

OKUMURA, H.; ISHII, H.; PICHIORRI, F.; CROCE, C. M.; MORI, M.; HUEBNER, K. Fragile gene product, Fhit, in oxidative and replicative stress responses. **Cancer Sci.**, v. 100, p. 1145-1150, 2009.

PALACIOS, J.; ROBLES-FRÍAS, M. J.; CASTILLA, M. A.; LÓPEZ-GARCÍA, M. A.; BENÍTEZ, J. The Molecular Pathology of Hereditary Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 75, p. 85-94, 2008.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 54-66, 2001.

PEKARSKY, Y.; PALAMARCHUK, A.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. *FHIT* as Tumor Suppressor: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Cancer Biol. Ther.**, v. 1, p. 232-236, 2002a.

PEKARSKY, Y.; ZANESI, N.; PALAMARCHUK, A.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. *FHIT*: from gene discovery to cancer treatment and prevention. **Lancet Oncol.**, v. 3, p. 748-754, 2002b.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PICHIORRI, F.; ISHII, H.; OKUMURA, H.; TRAPASSO, F.; WANG, Y.; HUEBNER, K. Molecular parameters of genome instability: roles of fragile genes at common fragile sites. **J. Cell Biochem.**, v. 104, p. 1525-1533, 2008.

RAISH, M.; DHILLON, V. S.; AHMAD, A.; ANSARI, M. A.; MUDASSAR, S.; SHAHID, M.; BATRA, V.; GUPTA, P.; DAS, B. C.; SHUKLA, N.; HUSAIN, S. A. Promoter Hypermethylation in Tumor Suppressing Genes p16 and *FHIT* and Their Relationship with Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status in Breast Cancer Patients from Northern India. **Transl. Oncol.**, v. 4, p. 264-270, 2009.

RAJAN, J. V.; WANG, M.; MARQUIS, S. T.; CHODOSH, L. A. *BRCA2* is coordinately regulated with *BRCA1* during proliferation and differentiation in mammalian epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 3078–3083, 1996.

RAKHA, E. A.; EL-SHEIKH, S. E.; KANDIL, M. A.; EL-SAYED, M. E.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O. Path. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. **Hum. Pathol.**, v. 39, p. 857–865, 2008.

RICE, J. C.; FUTSCHER, B. W. Transcriptional repression of *BRCA1* by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the *BRCA1* promoter. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 3233–3239, 2000.

ROLDÁN, G.; DELGADO, L.; MUSÉ, I. M. Tumoral expression of *BRCA1*, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. **Cancer Biol. Ther.**, v. 5, p. 505-510, 2006.

ROSEN, E. M.; FAN, S.; PESTELL, R. G.; GOLDBERG, I. D. BRCA1 Gene in Breast Cancer. **J. Cell. Physiol.**, v. 196, p. 19–41, 2003.

ROSEN, E. M.; FAN, S.; MA, Y. BRCA1 regulation of transcription. **Cancer Letters**, v. 236, p. 175–185, 2006.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 3156-3165, 2001.

RUSSELL, P. A.; PHAROAH, P. D.; DE FOY, K.; RAMUS, S. J.; SYMMONDS, I.; WILSON, A.; SCOTT, I.; PONDER, B. A.; GAYTHER, S. A. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. **Int. J. Cancer**, v. 87, p. 317-321, 2000.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SANTOS, S. C. L.; CAVALLI, L. R.; CAVALLI, I. J.; LIMA R. S.; HADDAD, B.; RIBEIRO, E. M. S. F. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and FHIT genes in patients with sporadic breast cancer from Southern Brazil. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, p. 374–377, 2004.

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 CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, p. 901-910, 2006.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J.; Analyzing real-time PCR data by the comparative C(t) method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCHWARZENBACH, H.; MULLER, V.; BEEGER, C.; GOTTBORG, M.; STAHMANN, N.; PANTEL, C. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 9, p. 5, 2007.

SEERY, L. T.; KNOWLDEN, J. M.; GEE, J. M.; ROBERTSON, J. F.; KENNY, F. S.; ELLIS, I. O.; NICHOLSON, R. I. BRCA1 expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers. **Int. J. Cancer**, v. 84, p. 258-262, 1999.

SHARMA, G.; MIRZA, S.; PARSHAD, R.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S. D.; PANDYA, P.; RALHAN, R. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. **Life Sci.**, v.87, p. 83-91, 2010.

SILVA SOARES, E. W.; SANTOS, S. C. L.; BUENO, A. G.; CAVALLI, I. J.; CAVALLI, L. R.; FOUTO MATIAS, J. E.; RIBEIRO, E. M. S. F. Concomitant loss of heterozygosity at the BRCA1 and FHIT genes as a prognostic factor in sporadic breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 1, p. 24-30, 2010.

SIPRASHVILI, Z.; SOZZI, G.; BARNES, L. D.; MCCUE, P.; ROBINSON, A. K.; ERYOMIN, V.; SARD, L.; TAGLIABUE, E.; GRECO, A.; FUSETTI, L.; SCHWARTZ, G.; PIEROTTI, M. A.; CROCE, C. M.; HUEBNER, K. Replacement of FHIT in cancer cells suppresses tumorigenicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 13771-13776, 1997.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SOZZI, G.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. FHIT in human cancer. **Cancer Res.**, v. 74, p. 141-66, 1998.

SYEED, N.; HUSAIN, S. A.; SAMEER, A. S.; CHOWDHRI, N. A.; SIDDIQI, M. A. Mutational and promoter hypermethylation status of FHIT gene in breast cancer patients of Kashmir. **Mutat. Res.**, epub, 2010.

TAPIA, T.; SMALLEY, S. V.; KOHEN, P.; MUÑOZ, A.; SOLIS, L. M.; CORVALAN, A.; FAUNDEZ, P.; DEVOTO, L.; CAMUS, M.; ALVAREZ, M.; CARVALLO, P. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors, **Epigenetics**, v. 3, p. 157-163, 2008.

TAYLOR, J.; LYMBOURA, M.; PACE, P. E.; A'HERN, R. P.; DESAI, A. J.; SHOUSHA, S.; COOMBES, R. C.; ALI, S. An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. **Int. J. Cancer**, v. 79, p. 334-342, 1998.

TERRY, G.; HO, L.; LONDESBOROUGH, P.; DUGGAN, C.; HANBY, A.; CUZICK, J. The expression of *FHIT*, *PCNA* and *EGFR* in benign and malignant breast lesions. **Brit. J. Cancer**, v. 96, p. 110 – 117, 2007.

THOMPSON, M. E.; JENSEN, R. A.; OBERMILLER, P. S.; PAGE, D. L.; HOLT, J. T. Decreased expression of *BRCA1* accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. **Nat. Genet.**, v. 9, p. 444-450, 1995.

TOMLINSON, I. P. M.; LAMBROS, M. B. K.; ROYLANCE, R. R. Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? **Gene. Chromosome Canc.**, v. 34, p. 349–353, 2002.

TURAGA, K.; ACS, G.; LARONGA, C. Gene expression profiling in breast cancer. **Cancer Control**, v. 3, p. 177-182, 2010.

VAN HEERDEN, W. F.; SWART, T. J.; ROBSON, B.; SMITH, T. L.; ENGELBRECHT, S.; VAN HEERDEN, M. B.; VAN RENSBURG, E. J.; HUEBNER, K. FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 2425-2428, 2001.

VAURY, C.; LAINE, R.; NOGUIEZ, P.; DE COPPET, P.; JAULIN, C.; PRAZ, F.; POMPON, D.; AMOR-GUÉRET, M. Human glutathione S-transferase CYP1A1*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. **Cancer Res.**, v. 55, p. 5520-5523, 1995.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **TIG.**, v. 9, p. 138-141, 1993.

WANG, T.; FREZZA, E. E.; RONG, M. A.; SAN-YUAN, H. U.; CHONG-ZHONG, L.; GUANG-YONG, Z.; WACHTEL, M. S.; XIAO-MEI, L.; JIN-BO, M.; CUI-XIA, L. Loss expression of active fragile sites genes associated with the severity of breast epithelial abnormalities. **Chinese Med. J-Pecking.**, v. 121, p. 1969-1974, 2008.

WEI, M.; GRUSHKO, T. A.; DIGNAM, J.; HAGOS, F.; NANDA, R.; SVEEN, L.; XU, J.; FACKENTHAL, J.; TRETIAKOVA, M. DAS S.; OLOPADE, O. I. *BRCA1* promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced *BRCA1* copy number and chromosome 17 aneusomy. **Cancer Res.**, v. 65, p. 10692-10699, 2005.

WEINBERG, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, v. 230, p. 770-776, 1985.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, p. 1138-1145, 1991.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; BIGGS, P.; HASHIM, Y.; SMITH, A.; CONNOR, F.; ARASON, A.; GUDMUNDSSON, J.; FICENCE, D.; KELSELL, D.; FORD, D.; TONIN, P.; BISHOP, D. T.; SPURR, N. K.; PONDER, B. A. J.; EELES, R.; PETO, J.; DEVILEE, P.; CORNELISSE, C.; LYNCH, H.; NAROD, S.; LENOIR, G.; EGILSSON, V.; BARKADOTTIR, R. B.; EASTON, D. F.; BENTLEY, D. R.; FUTREAL, P. A.; ASHWORTH, A.; STRATTON, M. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. **Nature**, v. 378, p. 789-792, 1995.

XIA, M.; SHERLOCK, J.; HEGERICH, P.; YOU, X.; LEE, K.; WALWORTH, C.; SPIER, E. **DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data**. IMECS – Hong Kong, 2010.

YAGER, J. D. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. **J. Nat. Cancer Inst. Monogr.**, v. 27, p. 67-73, 2000.

YANG, X.; LIPPMAN, M. E. *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer. **Breast Cancer Res. Tr.**, v. 54, p. 1-10, 1999.

YANG, Q.; SAKURAI, T.; MORI, I.; YOSHIMURA, G.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, Y.; SUZUMA, T.; TAMAKI, T.; UMEMURA, T.; KAKUDO, K. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. **Cancer**, v. 92, p. 54-60, 2001a.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SUZUMA, T.; TAMAKI, T.; UMEMURA, T.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, Y.; WANG, X.; MORI, I.; SAKURAI, T.; KAKUDO, K. Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription protein expression in breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3869–3873, 2001b.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, I.M.T.; KAKUDO, K. Chromosome 3p and breast cancer, **Am. J. Hum. Gen.**, v. 47, p. 453-459, 2002.

YOSHIKAWA, K.; HONDA, K.; INAMOTO, T.; SHINOHARA, H.; YAMAUCHI, A.; SUGA, K.; OKUYAMA, T.; SHIMADA, T.; KODOMA, H.; NOGUCHI, S.; GAZDAR, A. F.; YAMAOKA, Y.; TAKAHASHI, R. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1249-1261, 1999.

ZECH, L. Investigation at metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. **Exptl. Cell Res.**, v. 58, p. 463, 1969.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S.; FONG, K. M.; MAITRA, A.; LAM, S.; GERADTS, J.; ASHFAQ, R.; VIRMANI, A. K.; MILCHGRUB, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. 5' CpG Island Methylation of the *FHIT* Gene Is Correlated with Loss of Gene Expression in Lung and Breast Cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3581–3585, 2001.

ANEXO

Termo de Consentimento

Nome do estudo: “Análises citogenéticas e moleculares em carcinomas mamários”

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial. E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro