

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CRISTIANE YURI SHIGUEOKA**

**ALTA FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO DO GENE RECEPTOR DE  
PROGESTERONA EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA DE PACIENTES  
DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DAS GRAÇAS, CURITIBA-PR**

**CURITIBA  
2008**

**CRISTIANE YURI SHIGUEOKA**

**ALTA FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO DO GENE RECEPTOR DE  
PROGESTERONA EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA DE PACIENTES  
DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DAS GRAÇAS, CURITIBA-PR**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Patologia, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Giseli Klassen

**CURITIBA  
2008**

## AGRADECIMENTOS

À Dra Giseli Klassen por ter me recebido com tanta disponibilidade. Agradeço-a pelos ensinamentos e por toda a amizade, apoio, incentivo, além da confiança e paciência.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelos materiais e linhagens celulares cedidos.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento das amostras tumorais utilizadas neste trabalho, especialmente aos responsáveis pelo laboratório, Dra Enilze S. F. Ribeiro e Dr Iglénir João Cavalli, pela disponibilidade de informações sobre as amostras tumorais.

Ao Dr Fábio de Oliveira Pedrosa e Professor Dr Emanuel Maltempi de Souza pelo suporte financeiro através da participação no projeto Milênio.

Ao laboratório de Neurobiologia do departamento de Patologia pela disponibilidade de materiais, equipamentos e ao laboratório de Cultivo Celular.

Ao Dr Sílvio M Zanata pela total disponibilidade de uso do laboratório de Neurobiologia.

Ao Dr Roberto Andreattini e ao departamento de farmacologia pelos ensinamentos de bioestatística e pela disponibilidade dos programas de estatística utilizados neste trabalho.

Aos alunos e professores do departamento de bioquímica por dividir conosco os equipamentos e laboratórios.

Ao Dr Rubens S Lima pela disponibilização de amostras do banco de tumores e das informações das pacientes.

A todos os meus amigos que acompanharam a minha trajetória durante a Universidade. Ao Lucinir, por estar sempre presente, pela amizade e paciência.

A toda a turma do laboratório, Gerusa, Mariana, Edneia, Sinome, Fernando, Renata e Lia pela convivência e pelos bons momentos. Sem vocês, cada um a seu modo, certamente tudo teria sido mais difícil.

À Gerusa e à Mariana pela ajuda constante, pelo apoio, pelos ensinamentos e amizade. À Edneia pelo apoio e indispensáveis dicas de trabalho, sempre com muita disponibilidade, competência, amizade e alto astral. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado Renato que esteve presente em todo o meu período dentro da Universidade, sempre me apoiando com muito amor, compreensão, paciência e dedicação.

Aos meus irmãos, Marcelo e Ricardo, pela força, incentivo e confiança que sempre me passaram.

Aos meus pais pelo amor, dedicação, apoio e equilíbrio. Vocês são meus grandes exemplos.

## RESUMO

O câncer de mama é a principal neoplasia entre as mulheres. As características moleculares dos diversos tumores estão sendo estudadas e exploradas com o objetivo de se determinar o risco de desenvolvimento da doença, o prognóstico global e a resposta aos tratamentos (quimioterapia e radioterapia). Um desses genes envolvidos no processo de tumorigênese da mama que vem sendo utilizado como marcador molecular é o Receptor de Progesterona (RP). Os RP humanos são fatores de transcrição nuclear ativados por ligante e membro da família de receptores hormonais esteróides mediado pela ação do progesterona. O *PGR* existe em duas isoformas: *PGR-A* e *PGR-B* que são transcritos por um único gene sobre o controle de promotores distintos. O RP-B, que é funcionalmente ativo possui ilhas de CpG na região promotora e pode ser silenciado pela hipermetilação dessa região. Tem-se constatado que esse gene pode ter regulação da expressão por metilação. Nesse trabalho, o objetivo foi avaliar a hipermetilação da região promotora do gene *PGR-B* em amostras de tumores de mama pertencentes a pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças. Como controle foi utilizado DNA de linhagens tumorais. O DNA de todas as amostras foi tratado com agente deaminante bissulfito de sódio que é uma substância química que deamina citosinas não metiladas e deixa intactas citosinas metiladas. Primeiro foi feita a padronização das reações de PCR específico para o DNA tratado com bissulfito de sódio (MSP) com o DNA das linhagens (dados estabelecidos na literatura). Nos tumores de mama 67,12% das amostras estavam metiladas para o gene *PGR-B*. As análises estatísticas foram feitas com o teste do qui-quadrado utilizando  $p$  significativo  $< 0,05$ . A correlação entre o padrão de metilação e os dados clínico-patológicos das pacientes não apresentaram associação estatisticamente significativa para as variáveis: grau tumoral (SBR), estágio clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de RE, RP e ERBB2, acometimento de linfonodos, metástase, recidiva e tipos de tumor. Nossos dados sugerem que a hipermetilação da região promotora do gene receptor de progesterona é um evento precoce e comum em todas as etapas da tumorigênese do câncer de mama nas amostras analisadas. Devido ao provável silenciamento do gene *PGR* é necessário o acompanhamento dessas pacientes para entender o significado e a correlação desses dados com a resistência a terapia hormonal.

Palavras-chave: Câncer de mama. Epigenética. Receptor de progesterona B. Hipermetilação do promotor.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de Amônio
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
<i>BCL-2</i>	B-Cell Leukemia Lymphoma 2
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CpG	Citosina-Fosfato-Guanidina
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA Metil Transferase
dNTP	Desoxinucleotideo Fosfato
<i>E-CAD</i>	Epithelial Cadherin
EDTA	Etilenodiamino Tetra Acetato
ERBB2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
ERP	Elemento de Resposta a Progesterona
<i>ESR1</i>	Gene Receptor de Estrógeno
HDACs	Histone Deacetylase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IGF1	Insulin-Like Growth Factor 1
<i>MAPK</i>	Mitogen Activated Protein K
MBDs	Methyl Binding Domain Proteins
MSP	Methylation Specific PCR
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PGR</i>	Gene Receptor de Progesterona
<i>RAR<math>\beta</math></i>	Retinoic Acid Receptor $\beta$
<i>RASSF1A</i>	Ras-Association Domain Family 1A
RE	Proteína Receptor de Estrógeno
RP	Proteína Receptor de Progesterona
SBF	Soro Bovino Fetal
SBR	Scarff Bloom Richardson

SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
<i>SERPINB5</i>	Serpin Pptidase Inhibitor Clade B, Member 5
SYC	Spleen Tyrosine Kinase
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilenodiamina
TES	Tris-EDTA-SDS
<i>TIMP3</i>	Timp metallopeptidase inhibitor 3
TP16	Proteína de 16 kilo Daltons
TP21	Proteína de 21 kilo Daltons
TP53	Proteína de 53 kilo Daltons
TP73	Proteína de 73 kilo Daltons
TRIS	Tris (Hidroximetil) Amino Metano
UTR	Unstranlated Region

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 CÂNCER DE MAMA.....	9
1.1.1 Tipos de Câncer de Mama.....	10
1.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER.....	11
1.3 EPIGENÉTICA E CÂNCER.....	12
1.3.1 Hipermetilação dos Genes.....	14
1.4 MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA.....	15
1.4.1 Receptores de Estrógeno.....	16
1.4.2 Receptores de Progesterona.....	17
1.4.3 <i>ERBB2</i> .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	22
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS.....	23
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	23
3.4 TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO.....	24
3.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>PRG</i> EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP).....	25
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 8%.....	26
3.7 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	28
4.2 TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO E ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE <i>PGR</i> .....	29

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CORRELACIONADOS COM A METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>PGR-B</i> .....	35
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÂNCER DE MAMA

O tema deste trabalho consiste num ponto de grande relevância mundial. O câncer é o maior problema público de saúde em muitos países e está como o segundo causador de morte depois das doenças cardíacas (ACS, 2003).

O câncer de mama permanece como o segundo tipo mais freqüente mundialmente depois do pulmão, sendo o primeiro entre as mulheres com um número de casos estimado, para o ano de 2008, no Brasil, de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 71 novos casos a cada 100 mil (INCA, 2007). Esta doença possui um potencial metastático atingindo tecidos como os pulmões, ossos e fígado (HASEBE *et al.*, 2008).

Estudos prévios mostram que os fatores hormonais estão associados ao aumento do risco de câncer de mama. A ingestão de anticoncepcionais orais e a terapia de reposição hormonal devem ter, sempre, a relação risco – benefício bem avaliada. Outros fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença incluem: a idade avançada, a menarca precoce (antes dos 12 anos), a menopausa tardia (após os 50 anos), a nuliparidade ou a primeira gravidez após os 30 anos, a localização geográfica (país de origem) e o condição sócio-econômica. Ainda, há outros fatores comuns a outros tipos de câncer e que também estão associados ao câncer de mama como a obesidade pós-menopausa e a exposição à radiação ionizante. A prevenção primária deste câncer, porém, ainda não é totalmente possível já que os fatores de risco ligados à vida reprodutiva da mulher e características genéticas estão envolvidos em sua etiologia (RADICE; REDAELLI, 2003).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade para o câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda está sendo diagnosticada em estádios avançados.

### 1.1.1 TIPOS DE CÂNCER DE MAMA

Os sarcomas, correspondentes a menos de 1% das neoplasias malignas que comprometem as mamas, são em geral assintomáticos, podem atingir grandes dimensões e tem origem nos tecidos conjuntivos. Habitualmente estão vinculados à metástase via hematogênica, sendo os pulmões e os ossos os principais alvos (VIANA *et al.*, 2001).

Os carcinomas (tumores malignos de mama de origem epitelial) são classificados, de acordo com a localização e a extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, de acordo com a origem, em ductal ou lobular (FILHO, 2000; VIANA *et al.*, 2001).

O carcinoma ductal *in situ* (CD) representa a forma inicial, não invasiva e com bom prognóstico. Em mamografias aparecem como microcalcificações lineares, ramificadas ou em pequenos agrupamentos heterogêneos (FARIA, 1999; FILHO, 2000; VIANA *et al.*, 2001). Estudos apontam que aproximadamente 25 a 30% dos casos sem intervenção cirúrgica (mastectomia) que apresentam focos microscópicos deste carcinoma podem desenvolver, em um intervalo de 15 anos, o carcinoma invasivo (PAGE; ANDERSON, 1987).

O carcinoma lobular *in situ* (CL) corresponde de dez a 30% dos carcinomas *in situ* e representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do câncer invasor de mama (FARIA, 1999; FILHO, 2000). Ocorre, em geral, na área central da mama e no quadrante superior externo sendo que cerca de 50% desta neoplasia se desenvolve na mama oposta à biopsiada (FARIA, 1999).

O carcinoma ductal invasivo (CDI), que corresponde a 75% dos carcinomas de mama, pode apresentar: (1) regiões de necrose, de microcalcificação, de carcinoma *in situ*; (2) estroma geralmente fibroso; (3) massa palpável endurecida, com dois a três centímetros, em média (FARIA, 1999; FILHO, 2000). Em geral, cerca de dois terços dos casos já possui metástases ganglionares na ocasião do diagnóstico (PAGE; ANDERSON, 1987; FARIA, 1999).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) se origina em lóbulos e representa cerca de 10% dos casos. Este tipo de carcinoma possui bom prognóstico e sobrevivência de dez anos em 80 a 90% dos casos. Apresenta-se como uma massa palpável ou lesão

mal definida e difusa, sendo, neste caso, dificilmente detectada por mamografia. Em aproximadamente 60% dos casos verifica-se associação desse carcinoma ao carcinoma lobular *in situ* (FARIA, 1999; FILHO, 2000).

O carcinoma Inflamatório constitui de 1 a 3% dos cânceres de mama, cuja apresentação clínica caracteriza-se pelo predomínio dos fenômenos inflamatórios da pele da mama (flogose, eritema, aumento da temperatura local e nítido edema com espessamento cutâneo). Este carcinoma é uma das formas mais agressivas de câncer de mama (MENKE *et al.*, 2007).

A Doença de Paget representa 0,7 a 4% dos cânceres de mama. Caracteriza-se por alteração unilateral do mamilo e/ou da aréola, que pode incluir vesículas areolares recorrentes, eczema eritematoso crônico, lesão psoriática e até uma lesão erosiva (MENKE *et al.*, 2007).

O tumor Filodes, antigamente chamado de cistossarcoma filodes, não é muito freqüente, representando de 2 a 3% dos tumores fibroepiteliais com maior freqüência nas mulheres com idade entre os 30 e 40 anos. Macroscopicamente, o tumor é arredondado, bem-circunscrito e firme, apresentando diâmetros que variam de menos de 5 até 20 cm (MENKE *et al.*, 2007).

## 1.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER

O câncer é caracterizado por uma sucessão de alterações em vários genes. As primeiras etapas - iniciação e promoção - são decisivas para o estabelecimento da doença e incluem modificações em genes atrelados à regulação do ciclo celular. Ao se multiplicar, cada alteração é transmitida ao grupo de células descendentes determinando um crescimento clonal, de maneira que, em um dado momento, têm-se uma população de células alteradas, as quais escapam ao controle que regula a proliferação celular e começam a invadir tecidos e órgãos vizinhos, conferindo o caráter de progressão da doença maligna (VARMUS; WEINBERG, 1993; GESTER, 1995).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), existem seis alterações celulares comuns à maioria, ou até mesmo, a todos os tipos de câncer, a saber:

a) Auto-suficiência em fatores de crescimento: as células tumorais são capazes de sintetizar fatores de crescimento próprios e, desta maneira, escapam do controle do organismo.

b) Insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento: os mecanismos que impedem a multiplicação celular podem ser evitados pela síntese de moléculas promotoras da divisão celular e, também, pela hiperexpressão de oncogenes.

c) Evasão da apoptose: em alguns tumores a hiperexpressão do oncogene BCL-2 (elemento anti-apoptótico) e a inativação do *TP53* são estratégias que permitem o escape do processo fisiológico da apoptose.

d) Potencial replicativo ilimitado: algumas células conseguem se multiplicar infinitamente, tornando-se “imortais”. Essa imortalização é verificada na maioria dos tumores e pode decorrer, por exemplo, da expressão da enzima telomerase.

e) Angiogênese sustentada: o tumor é capaz de promover a formação de novos vasos sanguíneos para obtenção de oxigênio e nutrientes.

f) Invasão tecidual/metástase: alguns estudos apontam às moléculas de adesão intercelular e as proteases como os principais elementos envolvidos no processo de desagregação da massa tumoral e migração para outros tecidos, via circulação sanguínea.

### 1.3 EPIGENÉTICA E CÂNCER

A epigenética é um processo que envolve modificações herdáveis na expressão de um gene sem, no entanto, alterar a seqüência dos nucleotídeos (MOMPARLER, 2003), ao contrário das alterações genéticas.

Alterações epigenéticas diferem das genéticas principalmente pelo fato de ocorrerem numa freqüência maior, de serem reversíveis a tratamento com agentes farmacológicos e de ocorrerem em regiões definidas em genes específicos (WIDSCHWENDTER; JONES, 2002a). O acúmulo dessas múltiplas variações pode levar à expressão de um oncogene e a perda de função de um supressor tumor (YANG *et al.*, 2001).

A modificação das histonas é uma alteração epigenética juntamente com a metilação do DNA. As histonas possuem na sua porção amino-terminal resíduos de lisina conservados. Esses resíduos de carga positiva são passíveis de sofrer acetilação (VERMA; SRIVASTAVA, 2002) e metilação entre outras modificações pós-traducionais. Em geral, a acetilação das histonas ativa a transcrição enquanto a desacetilação das mesmas, encontradas em regiões de eucromatina ou heterocromatina, impossibilita a ligação da DNA polimerase inativando assim a transcrição. Já a metilação das histonas pode ser um marcador tanto para regiões ativas como inativas da cromatina (LACHNER; JENUWEIN, 2002).

O processo de metilação do DNA ocorre pela adição covalente de um grupo metil doado pelo S-adenosilmetionina para a posição 5 de citosinas adjacentes a guaninas, ou seja, os dinucleotídeos CpG (VERMA; SRIVASTAVA, 2002).

As regiões em que ocorrem CpG em frequência 10 vezes superior ao restante do genoma são chamadas Ilhas de CpG (ANTEQUERA *et al.*, 2003). Estas regiões, com tamanho em torno de 1 kb, geralmente estão associadas com o promotor e/ou o primeiro exon dos genes. No genoma humano, no mínimo 60% dos promotores de genes codificadores de proteínas estão associados a ilhas de CpG que, quando metilados, podem causar um estável silenciamento na transcrição. Isso inclui os genes constitutivos e os tecidos específicos. Dependendo da densidade da metilação na região promotora localizado 5' do sítio de início de transcrição de um gene, poderá afetar positiva ou negativamente a transcrição daquele gene (KLOSE; BIRD, 2006).

A metilação também apresenta um papel importante no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X, no silenciamento de parasitas intragenômicos e na carcinogênese (TAKAI; JONES, 2002). Assim, a metilação *de novo* anormal das ilhas de CpG é uma característica do câncer humano e é encontrado em seu estágio inicial (JONES; BAYLIN, 2002).

A adição do grupo metil no carbono 5 da citosina em dinucleotídeos CG é realizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), responsáveis por manter o padrão de metilação e pela metilação *de novo* (BIRD, 2002). Nas células neoplásicas a atividade desta enzima encontra-se elevada devido à grande proliferação celular, tumorigênese e progressão tumoral (YANG *et al.*, 2001).

O mecanismo mais simples para a manutenção da metilação depende da cópia de DNA semiconservativa com padrão de metilação da fita de DNA

progenitora (BIRD, 2002). Atualmente, sabe-se que a informação armazenada por ilhas de CpG hipermetiladas é, em parte, interpretada por proteínas que se ligam a resíduos metilados (MBDs - *MethylCpG Binding Proteins*). As MBDs são importantes “tradutoras” entre a metilação do DNA e genes modificadores de histonas que estabelecem um ambiente de cromatina transcricionalmente inativo (ESTELLER, 2007). Sabe-se que as MBDs podem recrutar complexos protéicos contendo co-repressores e histona deacetilases (HDACs) e, com base nessa interação, foi proposto que a ligação destes complexos ao DNA levaria a uma mudança na estrutura da cromatina impedindo a transcrição (YANG *et al*, 2001).

Há evidências de que as ilhas de CpG de uma variedade de genes são em grande parte desmetiladas em tecidos normais, porém, encontram-se metiladas em graus diferenciados no câncer humano, inclusive câncer de mama (YANG *et al.*, 2001). O gene é silenciado quando uma quantidade suficiente de CGs (em torno de 65 %) ou sítios críticos de CG estão metilados.

O câncer pode resultar de alterações anormais na metilação do DNA genômico como a hipermetilação e a hipometilação do promotor, do primeiro exon de proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. A hipermetilação do promotor de genes supressores de tumor causa silenciamento na transcrição. Por outro lado, a hipometilação de seqüências de DNA regulatórias ativa a transcrição de protooncogenes, retrotransposons, assim como genes que codificam proteínas envolvidas na instabilidade genômica e células metastáticas malignas (LUCZAK; JAGODZINSKI, 2006).

### 1.3.1. A HIPERMETILAÇÃO DOS GENES

No câncer de mama, os genes que têm sido mostrados metilados incluem aqueles associados com a replicação (*CDKN2A(p16)*, *CDKN1A(p21)*, ciclina *D2*, *RARβ*), crescimento (Receptor de estrógeno (*ERS1*) e Receptor de progesterona (*PGR*), *RASSF1A*, *SYK*), apoptose (*TP53*, *caspase8*), angiogênese (*TP73*, *SERPINB5 (Maspin)*) e tecidos invasores e metastáticos (*E-Cad*, *APC*, *TIMP3*) (WIDSCHWENDTER; JONES, 2002b). A identificação desses genes hipermetilados específicos têm ajudado a desvendar as patogêneses moleculares do câncer de

mama indicando qual via do controle de crescimento foi alterada, além de ter valores clínicos na detecção precoce desse câncer.

As ilhas de CpG hipermetiladas podem ser detectadas nos pacientes com câncer através de DNA extraído de saliva, soro e amostras de urina nos quais o DNA é liberado após apoptose ou necrose do câncer (JONES; BAYLIN, 2002).

Assim, a hipermetilação ocorre em genes importantes como o *ESR1* e *PGR*. A perda da expressão do *ESR1* foi associado com a hipermetilação anormal das ilhas de CpG em tumores e linhagens celulares no câncer de mama. Em 1995, FERGUSON *et al.* realizaram um tratamento das linhagens celulares MDA-MB-231 de câncer de mama receptor de estrógeno negativo (RE-) e receptor de progesterona negativo (RP-) com agentes desmetilantes e observaram a produção dessas duas proteínas sugerindo, assim, que a metilação tem um papel fundamental na inativação da transcrição desses genes. LAPIDUS *et al.* (1996) também estudaram o gene *PGR* nos tecidos de câncer de mama e observaram que as suas ilhas de CpG estavam hipermetiladas em tumores primários, sendo que em tecidos de mama normal não havia metilação.

A perda de expressão do *PGR* e do *ESR1* constitui um importante mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a hipermetilação tem papel importante neste contexto (LIU *et al.*, 2004). Para entender se a metilação é um fator prognóstico no câncer de mama devem-se conduzir vários estudos seguidos para que seja possível obter dados adequados de sobrevivência. A metilação como fator de prognóstico tem sido descrito, além do câncer de mama, também em câncer de bexiga, cabeça e colo, câncer ovariano (FENG *et al.*, 2007) e leucemia (LIU *et al.*, 2004).

#### 1.4 MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA

No câncer de mama, dentre os principais marcadores moleculares estão o oncogene *ERBB2* (c-erb ou neu ou HER2) e os receptores de hormônio esteróides como o receptor de estrógeno (RE) e o receptor de progesterona (RP).

### 1.4.3 ERBB2

O gene *ERBB2*, ou receptor do fator epidermal de crescimento 2, também conhecido como *neu* (nome do gene em rato) ou *HER2*, é um proto-oncogene que codifica para um receptor transmembrana de 185 kDA, p185<sup>HER-2</sup> (STERN *et al.*, 1986). O *ERBB2* é superexpresso em pelo menos ¼ dos cânceres de mama humano e está correlacionado com pior prognóstico em mulheres linfonodo positivo ou negativo e com o aumento do potencial de metástase (SLAMON *et al.*, 1989).

Anticorpos monoclonais diretamente contra p185<sup>HER-2</sup> foram produzidos e em diversos estudos esse anticorpos inibiram as células tumorais que superexpressam essa proteína (HUDZIAK *et al.*, 1989). Os efeitos desse anticorpo são citostáticos e promovem diminuição da resistência ao efeito citotóxico do fator de necrose tumoral que acompanha as células que superexpressam esse receptor.

Em geral, mulheres com carcinoma invasivo ERBB2+ possuem uma doença mais agressiva, com uma probabilidade maior de reincidência, um pior prognóstico e uma sobrevida menor, quando comparadas com as mulheres ERBB2- (HENRY; HAYES, 2006).

### 1.4.1 RECEPTORES DE ESTRÓGENO

O estrógeno, um hormônio esteroide sexual, exerce importantes funções biológicas em tecidos alvos como os órgãos reprodutivos. Alguns eventos desses tecidos são dependentes do estrógeno como o crescimento da glândula mamária e do endométrio durante a gestação e ciclo menstrual. Além dos efeitos proliferativos em células normais, o estrógeno é considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nesses órgãos, além de ser um regulador de expressão de vários genes, inclusive do receptor de progesterona (*PGR*). Estudos epidemiológicos mostram que a prolongada exposição ao estrógeno, como o que ocorre na menarca precoce, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, pode ser um dos fatores de risco de câncer de mama e útero (CLEMONS; GOSS, 2001; ROSE,

1996). A estimulação da proliferação celular mediada pela exposição prolongada aos estrógenos aumenta a probabilidade de erros espontâneos na replicação do DNA.

A ligação do estrógeno ao seu receptor induz o crescimento tumoral em câncer de mama RE+, presente em 60% dos casos deste tipo de câncer, sendo que 1/3 desses tumores perdem o receptor no momento do diagnóstico e uma fração perde a expressão durante o desenvolvimento do tumor (GIACINTI *et al.*, 2006). No entanto, para induzir a regressão do câncer que permanecem RE+, pode-se diminuir os níveis de estrógeno (terapia endócrina com drogas anti-estrogênicas) ou alterar a atividade do receptor como o tamoxifen.

Resumidamente existem 3 maneiras pelas quais os processos dependentes de estrógeno podem ser interrompidos. O primeiro método interfere com a ligação do estrógeno ao seu receptor RE e/ou promotores dos genes que ele regula. Moduladores seletivos de RE como tamoxifen e raloxifeno atuam desta mesma maneira. O segundo método é reduzir ou eliminar a expressão do *ESR1*. Isso é exemplificado pelo fulvestrant, que atua diminuindo a expressão do gene *ESR1*. O método mais direto significa simplesmente reduzir a quantidade de estrógeno interferindo na sua produção retirando-se os ovários das mulheres na pré-menopausa ou utilizando-se inibidores da aromatase (sistema de enzimas que convertem em diversos pontos como a testosterona ou o DHEA em 17  $\beta$ -estradiol) (FABIAN, 2007).

Especificamente o anti-estrógeno tamoxifen liga-se ao receptor tornando-o não funcional sendo que em torno de 2/3 dos tumores RE+ são inicialmente responsivos ao tamoxifen (GIACINTI *et al.*, 2006). Os inibidores de aromatase tais como o anastrozol e letrozol, que reduzem os níveis de estrógenos, são especialmente usados em pacientes que se tornam resistentes ao tamoxifen. Entretanto existem pacientes que se tornam resistentes a essas duas abordagens de tratamento (IKEDA e INOUE, 2004).

Os mecanismos que envolvem a resistência hormonal no câncer de mama são complexos e ainda pouco compreendidos. Existem evidências de sinalização cruzada entre RE e vários fatores de crescimento especialmente o receptor do fator de crescimento epidermal /ERBB2 (SCHIFF *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 RECEPTORES DE PROGESTERONA

O efeito do hormônio progesterona é mediado via receptor de progesterona, o qual, como àquele do estrógeno, é um importante marcador de prognóstico para as respostas na terapia endócrina nos pacientes com câncer de mama. Este receptor (RP) é um membro de subgrupos de receptores nucleares que incluem os receptores de andrógenos, mineralocorticóides e glucocorticóides.

O RP possui duas isoformas, RP-A e RP-B sendo ambas o resultado de transcrições alternativas entre dois promotores com iniciação e tradução a partir de códons AUG diferentes. Estruturalmente, RP-B difere de RP-A somente porque B possui 164 aminoácidos a mais na região N-terminal denominado domínio AF-3. Este domínio possui uma área que é requerida por genes alvos específicos que podem ser ativados por RP-B, mas não RP-A (SARTORIUS *et al.*, 1994).

A ligação da progesterona ao RP induz a alteração conformacional que leva a formação de homo ou heterodímeros e a dissociação das moléculas chaperonas *heat-shock* no citoplasma da célula. Ao estímulo da progesterona, o seu receptor sofre fosforilação nos sítios regulatórios (serinas) e os RP ativados se direcionam ao núcleo onde se associam aos co-reguladores, sendo este complexo ligado aos elementos de resposta à progesterona (ERP) na região promotora do gene-alvo resultando-o positivamente (ex: gene *MYC*). Na ausência dos ERP, as moléculas regulatórias (MAPK) são recrutadas pelo RP e pela mesma via, ativa a transcrição dos genes-alvo (LANGE, 2008).

Normalmente, em tecidos normais, as células expressam as duas isoformas em níveis equivalentes, enquanto nos tumores, predomina a expressão de uma isoforma, geralmente a RP-A (GRAHAM *et al.*, 1995). Sabe-se que RP-B funciona como um forte ativador de transcrição de vários promotores dependentes de RP (GRAHAM *et al.*, 1995) e, devido a esse controle pelo RP-B, a sua escassez em tumores pode alterar a funcionalidade normal do organismo. Além disso, a isoforma RP-A pode suprimir a atividade de transcrição de RP-B e outros receptores de esteróides (VEGETO *et al.*, 1993).

Pacientes com câncer de mama linfonodo positivo e que expressam predominantemente RP-A possuem pior prognóstico e baixa responsividade ao tratamento com hormônios que mulheres com maior expressão de RP-B (HOPP *et*

*al.*, 2004). A análise imuno-histoquímica do gene *PGR*, quando encontrado em níveis elevados de expressão, foi significativamente associado com tumores de tamanho menores, graus mais baixos, tumores RE+, baixa taxa mitótica e ainda, foi correlacionado com as idades de mulheres mais jovens. Além disso, dos tumores que estavam associados com lesões de mama benignos, 80% apresentou alta taxa de RP-B (CORMACK *et al.*, 2007).

SASAKI *et al.*, 2001 investigaram o estado de metilação de *PGR-A* e *PGR-B* em linhagens celulares de câncer de endométrio uterino utilizando a técnica de MSP e esclareceram que *PGR-B* é intensamente metilado em todas as linhagens desse tipo de câncer, enquanto *PGR-A* é desmetilado. Já em outros estudos de metilação de *PGR-A* e *PGR-B*, como na linhagem celular gástrica, no câncer de colorretal, nas linhagens celulares de pulmão e pâncreas, ambos receptores estavam metiladas em todas essas linhagens (LIU *et al.*, 2003). LIU *et al.* (2004), também analisaram amostras de leucemia e confirmaram a extensiva metilação das ilhas de CpG de *PGR-A* e *PGR-B*.

Sabe-se que o RE é o principal ativador de transcrição da expressão do gene *PGR-B* e, sendo assim, a presença do RP na célula indica a funcionalidade de *ESR1*. Sendo assim, os tumores RE-/RP+ poderiam refletir problemas metodológicos na análise no RE, resultando num falso negativo. Uma explicação alternativa seria a de que o RE deveria estar presente em níveis abaixo da capacidade de detecção; ainda, há a possibilidade de variantes de RE sem a capacidade de se ligarem ao hormônio ou ser reconhecido pelos anticorpos monoclonais, porém, que ainda são funcionais ao estímulo ao RP (FUQUA *et al.*, 1991).

O gene do *PGR* (11q21-23) tem uma ilha de CpG no primeiro exon, o qual contem 1kb de tamanho e 70% de conteúdo CG. A metilação dessa região tem sido demonstrada em tumores de mama RP- e em linhagens tumorais RP- (LAPIDUS *et al.*, 1996). Por volta dos anos 70, reconheceu-se que a transcrição do gene do receptor de progesterona era regulada pelo estrógeno em tecido reprodutivo e de mama. Essa atividade do RE foi observada num preparo a fresco de tumores RE+/RP- lisado de mama (SINGH *et al.*, 2003). Não se pode dizer, porém, que a negatividade do RP é devido à hipótese não funcional do *ESR1* (SINGH *et al.*, 2003). Descobriu-se que em torno de 75% dos cânceres de mama primários expressam RE e, em média, a metade desse número também expressa o RP (OSBORNE *et al.*,

2005); menos de 10% dos tumores expressam o RP na ausência do RE e, em torno de 20% desse câncer não expressa nenhum desses receptores (GROSS *et al.*, 1984). Há vários mecanismos que podem levar a perda do RP no câncer de mama como o baixo nível de estrógeno circulante em mulheres em pós-menopausa (BLOOM *et al.*, 1980); a hipermetilação do promotor com a subsequente redução na expressão do RP (LAPIDUS *et al.*, 1998); a perda genética do locus gênico do *PGR* (perda de heterozigose) (ROUSSEAU *et al.*, 1987); e o elevado nível de fator de crescimento (BALLEINE *et al.*, 1999; BAMBERGER *et al.*, 2000).

Várias pesquisas sugerem que o uso de terapia de reposição hormonal de estrógeno e progesterona combinados está associado com o risco elevado de CLI, relação pouco observada com os CDI. Os pacientes com CDI apresentam normalmente um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nos pacientes com tipos menos freqüente de carcinomas invasivos de mama. Estudos mostram, porém, que a taxa de incidência de CLI têm aumentado nos últimos 10 anos, enquanto os ductais invasivos têm-se mantido constante (DALING *et al.*, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação da região promotora do gene Receptor de Progesterona B em amostras de tumores de mama de pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR.

#### 2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivar as linhagens celulares de mama normal e tumorais.
2. Extrair DNA das linhagens normal, tumorais e dos tumores primários de mama;
3. Analisar o perfil de metilação do gene de estudo em amostras em DNA tratado com bissulfito de sódio através da técnica de MSP (*Methylation specific PCR*).
4. Correlacionar os dados obtidos com dados clínico-patológicos das pacientes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado no estudo foram linhagens celulares de tumor de mama cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer em São Paulo: MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436, MCF-7, HB4a, que é uma linhagem celular normal de mama e a linhagem ZR-75-3-1 adquirida do Banco de células BCRJ do Rio de Janeiro. A utilização do painel de células se justifica, do ponto de vista técnico, pela disponibilidade de grandes quantidades de materiais, assim como pela ausência de contaminação com células normais. Do ponto de vista teórico, o estudo da metilação diferencial nessas linhagens foi amparado por um conhecimento já bem consolidado pelo grupo do Instituto Ludwig em São Paulo.

Além disso, foram utilizadas 76 amostras de tumores primários de mama, dentre eles 51 amostras de carcinomas ductais invasivos, 1 amostra de carcinoma ductal *in situ*, 21 amostras de carcinomas lobulares invasivos e 3 amostras de fibroadenomas (considerados neste estudo como amostras ausentes de malignidade). As amostras tumorais foram gentilmente cedidas pela Dra. Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglénir João Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras catalogadas neste Banco de Tumores foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes (o modelo do termo de consentimento está no anexo 1) e aprovação do Comitê de Ética Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003 do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR (proveniência das amostras sob responsabilidade do Dr Rubens Silveira Lima).

### 3.2 CULTIVO DE CÉLULAS

Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, Garamicina (40 µg/mL) para evitar contaminação bacteriana, Ciprofloxacina (10 µg/mL) para evitar contaminação por espécies do gênero *Mycoplasma*, Anfotericina B (2,5 µg/mL) para evitar contaminação por fungos. Algumas linhagens receberam suplementação de hormônios como Insulina (5 µg/mL) para as linhagens HB4a, MDA-MB-435 e MDA-MB-436, e hidrocortisona (100 µg/mL) no caso da linhagem HB4a. As amostras contendo aproximadamente  $10^6$ /mL células foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas a 37°C e repassadas dos tubos criogênicos para uma garrafa pequena (24 cm<sup>3</sup>) contendo aproximadamente 4 mL de meio de cultura e acondicionadas na estufa com tensão de CO<sub>2</sub> a 5%. O meio de cultura foi regularmente trocado dependendo da necessidade ou em dias alternados.

A confluência de aproximadamente 90% das células foi o indicativo para expansão da garrafa pequena para a média (80 cm<sup>3</sup>). Neste processo, as células foram tratadas com TrypLE™ Express (Gibco), em quantidade suficiente para cobrir a superfície da garrafa onde as células estão aderidas e incubadas por 3 a 5 minutos em estufa a 37°C. Após este tempo foi adicionado o dobro de meio de cultura completo para inativação da tripsina. As células soltas foram então centrifugadas a 700 x g, retirado o meio e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 novo transferidas para a nova garrafa e levadas à estufa de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O perfil de metilação da região promotora do gene *PGR* foi avaliado através de tratamento do DNA com bissulfato de sódio. Para tanto, o DNA genômico das diferentes linhagens foi primeiramente extraído através do método de fenol/clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As linhagens celulares em estudo foram crescidas, concentradas por centrifugação e digeridas em 4 mL de tampão TES (1M Tris/HCl, 0,5M EDTA e 10%

SDS) contendo 100 µg/ml de Proteinase K durante toda a noite. No dia seguinte, foi feita extração com 1 volume de fenol/clorofórmio e após a obtenção de uma emulsão homogênea a mistura foi centrifugada a 700 x g por 10 min e o processo foi repetido até ser obtido uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Depois da recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado a -20°C durante a noite toda com 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 4°C a 8100 x g por 30 minutos, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, transferido para tubos de 1,5 mL, seco em estufa e ressuspenso em água ultrapura estéril e armazenado a 8°C. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro e gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo a 0,2 µg/mL.

### 3.4 TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

Os DNAs das linhagens devidamente quantificados em espectrofotômetro Nanodrop (Instituto Ludwig) e dos tumores primários de mama, quantificados no espectrofotômetro Gene QuantII foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas em uracilas que após a reação de PCR, são convertidas em timinas, mantendo as citosinas metiladas como citosinas já que o grupamento metila protege contra a reação de deaminação.

O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação do método de JERÓNIMO *et al.* (2001) como descrito a seguir. Inicialmente, aproximadamente 1 µg de DNA genômico foi misturado a 0,5 µg/µL de DNA de esperma de salmão e a mistura foi desnaturada com 0,3 M de NaOH a 50°C por 20 minutos. Após a desnaturação seguiu-se a modificação do DNA com bissulfito de sódio. Nesta etapa, o DNA foi incubado a 70°C durante 3 horas com 500 µL de uma solução alcalina de bissulfito de sódio/hidroquinona (2,5 M NaHSO<sub>3</sub>, 350 mM NaOH e 125 mM C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida, foi adicionado às amostras 1 ml de uma resina (*Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification Resin, Promega*). A mistura foi passada em uma coluna de purificação (*Wizard Minicolumns, Promega*), foi lavada com 4 mL de isopropanol 80%, seguido de tratamento com NaOH 0,3M para

completa deaminação do DNA e sua precipitação com acetato de amônio 5 M e 350  $\mu$ L de etanol absoluto. Na etapa de precipitação do DNA, foi adicionado 1  $\mu$ L de glicogênio 20mg/mL. O DNA modificado foi incubado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período de 16 a 20 horas. No dia seguinte, após centrifugação durante 30 minutos a 15900 x g e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuscitado em 30  $\mu$ L de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0).

Utilizamos também EpiTect® Bissulfite kit (Qiagen) para o tratamento com bissulfito de sódio dos DNAs das linhagens e DNAs tumorais, segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

### 3.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *PGR* EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP)

O estudo da metilação do gene *PGR* em DNA de amostras de tumores primários de mama foi feito utilizando-se iniciadores segundo SASAKI *et al.* (2002) desenhados especificamente para a técnica de MSP descrita por HERMAN *et al.*, 1996. Os iniciadores foram desenhados para a situação metilada (gene desligado por metilação) e para a região rica em CpG a qual possui pelo menos um dinucleotídeo CG diferencialmente metilado dentro da sua seqüência. Os pares de iniciadores utilizados foram RP-B universal 5' TGA TTG TCG TTC GTA GTA CG 3' e RP-B reverso 5' CGA CAA TTT AAT AAC ACG CG 3'.

As reações de MSP foram padronizadas variando-se a temperatura e o tempo de anelamento, a concentração final de  $\text{MgCl}_2$  na reação, o número e o tempo de duração dos ciclos.

A reação padronizada foi realizada em um volume final de 20 $\mu$ L contendo solução tampão 1X; 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 200  $\mu$ M de dNTPs; 8 pmoles de cada iniciador (universal e reverso); 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 0,5  $\mu$ L de DNA tumoral tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para a ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, 15 segundos a  $54^{\circ}\text{C}$  de temperatura de anelamento e 45 segundos de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ ; e uma extensão final de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Como

controles foram utilizados os DNAs das linhagens MCF-7, HB4a e ZR-75-3-1 (não metiladas) e MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436 (metiladas). (YANG *et al.*, 2001; MIRZA *et al.*, 2007). As reações foram analisadas em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata, como descrito a seguir.

### 3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 8%

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados em gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida 8% foram feitos utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (*Life Technologies*) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação.

As eletroforeses foram conduzidas em aparato de gel médio a 100 V por aproximadamente 1 hora. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método de SANGUINETTI *et al.*, 1994. Para revelar, cada gel de aproximadamente 56 cm<sup>2</sup> foi incubado por 10 minutos em 50 mL de solução fixadora (0,75% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação, à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado 1 mL de nitrato de prata (10%) e o gel incubado por mais 10 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o fixador foi desprezado e o gel foi lavado com água filtrada em Millipore. Para revelação foi adicionado 50 mL de solução de hidróxido de sódio 3% e 0,7 mL de formaldeído 37% e incubado sob agitação até o aparecimento de uma coloração castanho escura do DNA impregnado. Após a revelação, o gel foi incubado em 50 mL de solução fixadora por 10 minutos, lavado com água ultrapura e a seguir seco em papel celofane.

### 3.7 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Para cada um dos casos foram levantados os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise dos laudos das biópsias dos tumores

primários e dos prontuários do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital das Clínicas com o auxílio do Dr. Rubens Silveira Lima.

Os dados clínicos levantados foram: idade da paciente na data do diagnóstico da doença, estadiamento do tumor segundo a classificação TNM da União Internacional contra o Câncer (classificação no anexo 2), tamanho do tumor, classificação do grau histológico tumoral conforme SBR (*Scarff-Bloom-Richardson*), comprometimento linfonodal, a presença dos marcadores moleculares RE, RP e ERBB2, a presença de metástase no momento e no seguimento terapêutico da paciente, o aparecimento de recidivas e óbito.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise da associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando o programa SPSS 12.0 (*Statistical Package for Social Science*) através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer. Foi estabelecido um erro de 5%, ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi baseado no trabalho recente sobre a hipermetilação do promotor do receptor de progesterona em câncer de mama (CORMACK *et al.*, 2007). Utilizamos como controles DNA de linhagens tumorais que já haviam sido descritas na literatura e assim padronizamos a reação de MSP para posterior trabalho com as amostras de tumores primários. Todas as amostras de DNA foram tratadas com bissulfito de sódio antes da reação de MSP para transformar as citosinas não metiladas em timinas após a reação de PCR e assim discernir entre amostras contendo o gene metilado do não metilado. A seguir são mostrados os resultados obtidos passo a passo.

### 4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

As linhagens celulares para serem utilizadas como controles foram cultivadas para posterior realização da extração do DNA. A qualidade do produto purificado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como controle DNA de massa molecular padrão conhecida. A Figura 1 mostra o perfil de migração das amostras de DNA purificado.

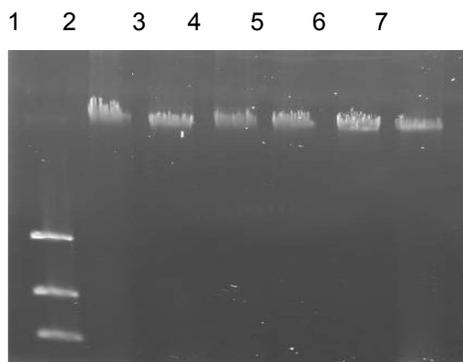


FIGURA1 – GEL DE AGAROSE 1% UTILIZADO PARA A ELETROFORESE DE DNA GENÔMICO. 1.LOW DNA MASS LADDER (BANDA SUPERIOR EQUIVALE A 200 ng); 2.MDA-MB-436; 3.MDA-MB-231; 4.MDA-MB-435; 5.MCF-7; 6.HB4a; 7.ZR-75-3-1

As amostras no gel mostram que a purificação foi feita com qualidade e quantidade significativa. A comparação com o marcador de massa molecular mostra que existe pelo menos 200 ng de cada DNA aplicado. Além disso, a presença de uma banda única mostra a integridade do DNA purificado que, em outras palavras, não se encontra danificado por quebras em múltiplos pontos.

As amostras de DNA foram a seguir quantificadas por espectrofotometria com leitura de razão 260/280 nm. A leitura foi realizada no Instituto Ludwig em São Paulo em Equipamento de alta precisão, o espectrofotômetro Nano Drop ND 1000.

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DOS DNAs EXTRAÍDOS DE LINHAGENS TUMORAIS

Linhagem (amostra)	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Razão 260nm/280nm	Razão 260/230nm
MDA-MB-436	70,4	1,92	1,23
MDA-MB-231	90,8	1,89	2,52
MDA-MB-435	91,2	1,92	2,52
HB4a	112,5	1,93	1,89
MCF-7	67,5	1,89	2,33
ZR-75-3-1*	238,7	0,49	-

\* A linhagem ZR75-3-1 foi quantificada no Gene QuantII.

FONTE: O autor (2008)

O espectrofotômetro Nano Drop ND 1000 tem uma melhor precisão em relação ao GeneQuant II, além disso, ele utiliza apenas 2  $\mu$ L da amostra, evitando dessa forma erros de diluição. Observa-se pela Razão 260nm/280nm que os DNAs estavam com boa pureza. A Razão 260/230nm diz respeito à quantidade de sais na amostra e quanto maior a Razão, melhor. Algumas das amostras estão com uma concentração um pouco elevada de sais, porém pelos resultados posteriores observa-se que esse fator não influenciou nos resultados.

#### 4.2 TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO E ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE *PGR-B*.

Após a quantificação, o DNA das linhagens foi submetido ao tratamento com o agente de deaminação *in vitro* denominado bissulfito de sódio.

Como controle de eficiência do tratamento, foi feita uma reação de PCR *nested* do gene SATR1 (COSTA *et al*, 2006) do qual se esperava um fragmento de

690 pb se o tratamento com bissulfito fosse eficiente e se o DNA tratado encontrava-se em quantidade suficiente para obter os produtos de PCR. Na Figura 2 observamos que o tratamento foi eficiente. Todas as amostras amplificaram o fragmento de DNA esperado.

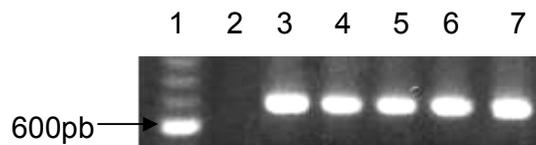


FIGURA 2 - CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO - FRAGMENTO DO GENE SATR1 AMPLIFICADO POR PCR *NESTED*. 1. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; 2.NO(CONTROLE NEGATIVO); 3.MDA-MB-436; 4.MDA-MB-231; 5.MDA-MB-435; 6.HB4A; 7.MCF-7

Estas linhagens tumorais tratadas com bissulfito de sódio foram, então, utilizadas para a padronização das reações de MSP e o resultado esperado era que a banda correspondente a 200 pb fosse amplificada (DNA metilado).

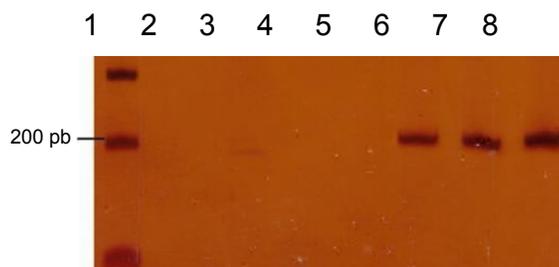


FIGURA 3 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MSP NAS LINHAGENS TUMORAIS. 1.MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; 2.NO (CONTROLE NEGATIVO); 3.HB4a; 4.MCF-7; 5.ZR-75-3-1; 6.MDA-MB-231; 7.MDA-MB-435; 8.MDA-MB-436

A etapa de padronização dos iniciadores é essencial. Estes devem produzir a banda da reação metilada somente nas linhagens que apresentam o gene silenciado (segundo dados da literatura). Somente assim é possível ter confiabilidade nas reações com as amostras tumorais. Nossos resultados mostraram que as linhagens HB4a, MCF-7 e ZR-75-3-1 não estão metiladas, enquanto as MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MDA-MB-436 apresentaram bandas de 200pb, mostrando-se metiladas para o promotor do gene *PGR-B* como previamente descrito por YANG *et al.*, 2001 e MIRZA *et al.*, 2007 (com exceção da MDA-MB-436). Embora houvesse a presença de bandas inespecíficas elas estavam longe do fragmento desejado. A partir desses

dados partimos para as reações de MSP com as amostras de tumores primários de mama do Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética.

O DNA dos tumores foi extraído pelo protocolo do fenol-clorofórmio pelo laboratório de Genética e alguns também pelo nosso laboratório (seguindo o mesmo protocolo de extração de DNA de linhagens celulares). Os DNAs extraídos foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio.

A figura 4 mostra o aspecto de alguns DNAs tumorais extraídos. Percebe-se que quase todos apresentam um pouco de degradação, ou seja, o DNA possui quebras em pontos múltiplos apresentando um aspecto arrastado no gel, porém, observa-se pela banda formada acima do arrastado, que ainda existe DNA genômico íntegro nas amostras. Sabemos que no momento estão estocadas adequadamente a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sabe-se que o ideal é o que se faz no Hospital do Câncer em São Paulo onde a estocagem das amostras é feita em nitrogênio líquido com material resinoso especial. Além disso, essa degradação observada pode ser também devido ao fato de que as peças tumorais talvez não tenham sido congeladas imediatamente após a cirurgia ou que o transporte não tenha sido feito em nitrogênio líquido como recomendado. Todos estes fatores em conjunto acabaram por levar as amostras a perder a integridade de suas macromoléculas, porém os experimentos demonstraram que a degradação não impediu que a técnica de MSP funcionasse.

Em seguida, foi feito o tratamento desses tumores primários com bissulfito de sódio e também o controle de eficiência do tratamento com a reação de PCR *nested* do gene SATR1 (COSTA *et al*, 2006) da mesma forma que foi feito para as linhagens.

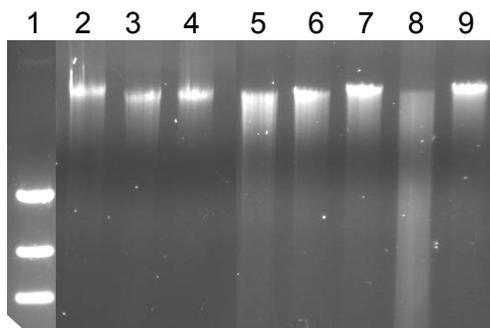


FIGURA 4 - EXTRAÇÃO DOS DNAs TUMORAIS – 1. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; DE 2 A 9 SÃO ASPECTOS DOS DNA EXTRAÍDOS DE 8 AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DAS PACIENTES EM ESTUDO

Abaixo, estão todos os resultados obtidos por MSP separados por tipo de tumor (ductal ou lobular) e grau histológico (SBR).



FIGURA 5 - MSP DA AMOSTRA DE FIBROADENOMAS - M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP E OS NÚMEROS 1, 2 e 3 CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS TUMORAIS



FIGURA 6 - MSP DA AMOSTRA DE CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP E O NÚMERO 4 CORRESPONDE AO NÚMERO DA AMOSTRA TUMORAL

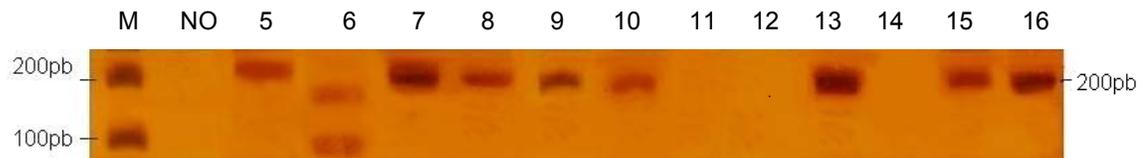


FIGURA 7 - MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE GRAU I (SBR) – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP E OS NÚMEROS CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS 5 A 16

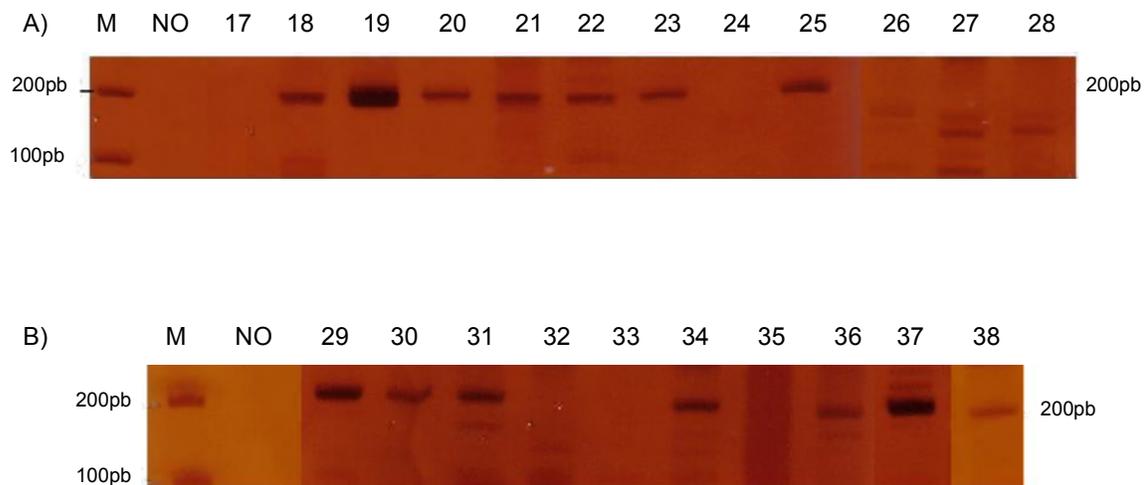


FIGURA 8 - MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE GRAU II (SBR) – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP; OS NÚMEROS CORRESPONDEM AS AMOSTRAS. A) AMOSTRAS DE 17 A 28. B) AMOSTRAS DE 29 A 38

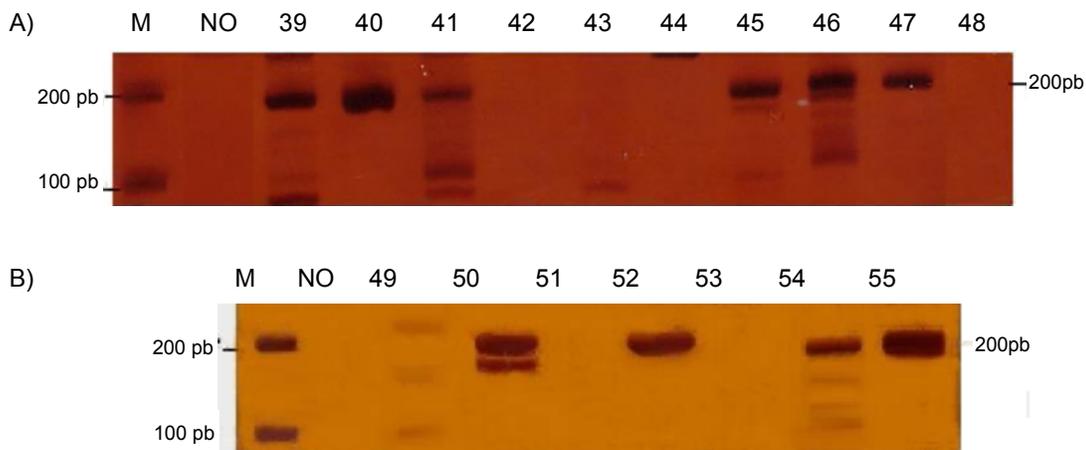


FIGURA 9 - MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE GRAU III (SBR) – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP E OS NÚMEROS CORRESPONDEM AS AMOSTRAS. A) AMOSTRAS DE 39 a 48. B) AMOSTRAS DE 49 A 55

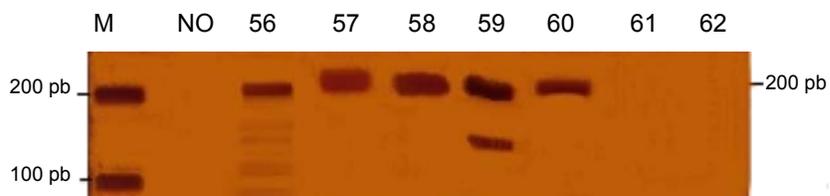


FIGURA 10 - MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA LOBULAR INVASIVO DE GRAU I (SBR) – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP; OS NÚMEROS CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS 56 A 62

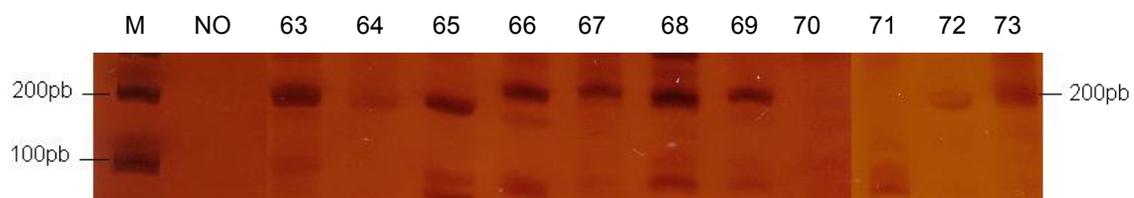


FIGURA 11 - MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA LOBULAR INVASIVO DE GRAU II (SBR) – M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; NO É O CONTROLE NEGATIVO DO MSP; OS NÚMEROS CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS 63 A 73

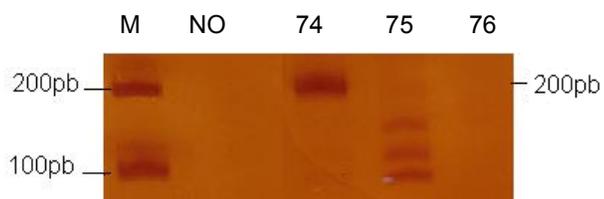


FIGURA 12. MSP DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA LOBULAR INVASIVO DE GRAU III E GRAU INDETERMINADO (SBR); M É O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 100 pb; NO é o CONTROLE NEGATIVO DO MSP; OS NÚMEROS CORRESPONDEM ÀS AMOSTRA 74 A 76

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CORRELACIONADOS COM A METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *PGR-B*.

A tabela do anexo 4 contém os dados clínicos das pacientes cujos tumores foram analisados neste estudo e seus respectivos resultados de MSP. Na tabela 2, abaixo, estão mostrados os dados da análise estatística e a correlação entre a metilação e as variáveis clínicas das 73 amostras tumorais malignas. As outras 3 amostras são de fibroadenomas que não entraram nessa análise, já que foram considerados no presente trabalho como controles não malignos.

Então, das 73 amostras, 14 (20,0%) foram diagnosticadas com estágio I/0, 33 (47,1%) com estágio II, 13 (18,6%) com estágio III e 10 (14,3%) com estágio IV, sendo que 3 amostras não foram classificadas para esta variável. O tamanho do tumor foi avaliado nas 73 amostras, das quais 20 (27,4%) estão classificadas como T1 (tumor menor ou igual a 2 cm), 38 (52,1%) estão classificadas como T2 (tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm), 8 estão classificadas como T3 (tumor maior que 5 cm) e 7 estão classificadas como T4 (tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou edema, ulceração da pele, ou carcinoma inflamatório).

O comprometimento linfonodal foi avaliado em 71 amostras, dentre as quais 37 (52,1%) apresentaram linfonodos comprometidos. Além disso, foi verificado que 14 (20,3%) de 69 pacientes apresentaram metástases à distância com óbito. As recidivas locais foram avaliadas em 69 amostras, aparecendo em 6 (8,7) pacientes.

A avaliação da expressão de receptores hormonais apresentou positividade para receptor de estrógeno em 58 (82,9%) das 70 amostras avaliadas, já para receptor de progesterona, das 61 amostras determinadas, 46 (75,4%) são positivas. A expressão de ERBB2 foi diagnosticada em 65 amostras, sendo que 22 (33,8%) destas são positivas.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES ANALISADAS E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *PGR* AVALIADAS PELO TESTE DO QUI-QUADRADO OU TESTE EXATO DE FISCHER\*

Variável	Pacientes Número (%)	Metilação		p
		Sim	Não	
<b>Estádio</b>				
0/I	14 (20,0)	8 (57,1)	6 (42,9)	0,733
II	33 (47,1)	22 (66,7)	11 (33,3)	
III/IV	23 (32,9)	16 (69,6)	7 (30,4)	
<b>Tamanho do tumor</b>				
pT1/pTis	20 (27,4)	13 (65,0)	7 (35,0)	0,403
pT2	38 (52,1)	23 (60,5)	15 (39,5)	
pT3/pT4	15 (20,5)	12 (80,0)	3 (20,0)	
<b>SBR</b>				
I	19 (27,1)	13 (68,4)	6 (31,6)	0,975
II	33 (47,1)	23 (69,7)	10 (30,3)	
III	18 (25,7)	12 (66,7)	6 (33,3)	
<b>Comprometimento de linfonodos</b>				
Negativo	34 (47,9)	24 (70,6)	10 (29,4)	0,62
Positivo	37 (52,1)	23 (62,2)	14 (37,8)	
<b>Receptor de Estrógeno (RE)</b>				
Negativo	12 (17,1)	8 (66,7)	4 (33,3)	1,00
Positivo	58 (82,9)	39 (67,2)	19 (32,8)	
<b>ERBB2</b>				
Negativo	43 (66,2)	29 (67,4)	14 (32,6)	0,98
Positivo	22 (33,8)	14 (63,6)	8 (36,4)	
<b>Receptor de progesterona (RP)</b>				
Negativo	15 (24,6)	10 (66,7)	5 (33,3)	1,00
Positivo	46 (75,4)	31 (67,4)	15 (32,6)	
<b>Metástase/óbito</b>				
Negativo	55 (79,7)	37 (67,3)	18 (32,7)	1,00
Positivo	14 (20,3)	9 (64,3)	5 (35,7)	
<b>Recidiva</b>				
Negativo	63 (91,3)	44 (36,5)	19 (63,5)	0,09
Positivo	6 (8,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	

Variável	Pacientes Número (%)	Metilação		p
		Sim	Não	
<b>Tipo de tumor</b>				
Carcinoma Ductal Invasivo	51 (70,8)	33 (64,7)	18 (35,3)	<b>0,78</b>
Carcinoma Lobular Invasivo	21 (29,2)	15 (71,4)	6 (28,6)	

\*FONTE: O autor (2008)

Foram feitas análises para avaliar a existência de correlações estatísticas entre a metilação na região promotora do gene *PGR-B* e as variáveis clínicas sendo obtidos os valores de p para cada análise. Os resultados foram obtidos para o estágio ( $p=0,733$ ), o grau de diferenciação histológica (SBR) ( $p=0,975$ ), o comprometimento de linfonodos ( $p=0,62$ ), a ocorrência de metástases à distância ( $p=1,00$ ) e recidivas locais ( $p=0,09$ ), o tipo do tumor ( $p=0,78$ ), a expressão de receptores hormonais (RE,  $p=1,00$  e RP,  $p=1,00$ ) e o receptor de fator de crescimento ERBB2 ( $p=0,98$ ). A partir desses dados pode-se observar a ausência de correlações estatísticas significativas entre a metilação do gene *PGR-B* e as variáveis analisadas, sendo uma dessas variáveis a expressão da proteína RP. Essa falta de correlação entre a metilação do promotor do gene em estudo e a expressão de sua proteína concorda com os resultados do trabalho de CORMACK *et al.*, 2007. Por outro lado, o estudo de MIRZA *et al.* (2007), mostrou a existência de correlação entre a metilação do *PGR-B* e a diminuição na sua expressão em imuno-histoquímica. Os autores comentam que esse dado deve ser visto com cuidado porque a alteração epigenética não seja o único mecanismo para a redução dos níveis dessa proteína.

Neste trabalho, 49/73 (67,12%) das amostras estavam metiladas para o gene *PGR-B*. Das 73 amostras 61 tinham os dados de imuno-histoquímica para RP. Destas 61 amostras, 15 têm RP negativo. Destas 15, 10 apresentaram metilação da região promotora de *PGR*, ou seja, 66,7% das amostras RP negativo. A questão é, porque não observamos 100% de metilação nas amostras RP negativo? Talvez porque no câncer de mama, existem vários mecanismos que podem levar a redução ou a perda total do RP. O baixo nível de estrógeno circulante em mulheres em pós-menopausa pode ser um motivo para a baixa ou ausência de expressão desse receptor, já que não é capaz de estimular o RE a sintetizar RP (BALLEINE *et al.*,

1999). Na nossa amostra temos 9 pacientes pós-menopáusicas com RP-. Outro mecanismo para a redução dos níveis de RP pode ser a perda genética do locus do *PGR* (perda de heterozigose) em alguns tumores (ROUSSEAU *et al.*, 1987). Ainda, a superexpressão de ERBB2 pode explicar a perda do RP além da resistência ao tamoxifen (OSBORNE *et al.*, 2005).

Por outro lado das 61 amostras analisadas 46 tem RP positivo na imunohistoquímica. Destas 46 amostras, 31 apresentaram a banda específica do gene *PGR*. Nesse caso o dado foi surpreendente. Porque tantos tumores positivos para RP apresentam metilação do gene? Analisando detalhadamente a tabela no anexo 4 verificamos que 18 amostras apresentam reatividade de RP menor do que 30% na imunohistoquímica. Isto pode significar reação inespecífica dos anticorpos anti-RP utilizados dando um falso positivo, ou que a nossa reação pode estar prejudicada mostrando bandas que na verdade não existem. Essa última hipótese poderia ser descartada com o sequenciamento da banda obtida e análise dos CGs metilados diretamente. De qualquer forma estes dados mostram uma extrema importância do acompanhamento clínico das pacientes. Nossos dados podem ser um indício de futura resistência a terapia hormonal pelas pacientes nas quais o tumor apresenta baixa taxa da proteína.

Dessa forma, é preciso que o médico responsável seja comunicado sobre os dados obtidos. Dados mais conclusivos sobre os resultados só podem ser obtidos com esse acompanhamento das pacientes ao longo do tempo, fato que será realizado no decorrer dos próximos meses.

## 5 CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que a hipermetilação da região promotora do gene receptor de progesterona é um evento precoce e comum em todas as etapas da tumorigênese do câncer de mama nas amostras analisadas.

Devido ao provável silenciamento do gene *PGR* é necessário o acompanhamento dessas pacientes para entender o significado e a correlação desses dados com a resistência a terapia hormonal.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN CÂNCER SOCIETY. Estatística 2006 – câncer de mama. Disponível em: <http://www.cancer.org> [16 Jun 2008]

ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, n.8, p.1647–1658, 2003.

ARPINO, G.; WEISS, H.; LEE, A. V.; SCHIFF, R.; PLACIDO, S.; OSBORNE, C.K.; ELLEDGE, R.M. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptorexpression and tamoxifen resistance. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, n.17, p.1254-1261. 2005.

BALLEINE, R. L.; EARL, M. J.; GREENBERG, M. L.; CLARKE, C. L. Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. **British Journal of Cancer**, n.79, p.1564 – 1571, 1999.

BAMBERGER, A. M.; MILDE-LANGOSCH, K.; SCHULTE, H. M.; LONING, T. Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicpathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. **Hormone Research**, n.54, p.32 – 37, 2000.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BLOOM, N. D; TOBIN, E. H; SCHREIBMAN, B; DEGENSHEIN, G. A. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. **Cancer**, vol. 12, n. 45, p. 2992–2997, 1980.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, n. 344, p. 276-285, 2001.

CORMACK, O. M.; CHUNG, W. Y.; FITZPATRICK, P.; COOKE. FLYNN, B.; HARRISON, M.; FOX, E.; GALLAGHER, E.; McGOLDRICK, A.; DERVAN, P. A.; McCANN, A.; KERIN, M. J. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast câncer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2007.

COSTA, F.F; PAIXÃO, V.A.; CAVALHER, F.P; RIBEIRO K.B.; CUNHA, I.W.; RINCK, J.A.; O'HARE, M.; MACKAY, A.; SOARES, F.A.; BRENTANI, R.R.; CAMARGO, A.A. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast câncer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 165, p. 135-143, 2006.

DALING JR, MALONE, K. E.; DOODY, D. R. Relation of regimens of combined hormone replacement therapy to lobular, ductal, and other histologic types of breast carcinoma. **Cancer**, n. 95, p. 2455-2464, 2002.

ESTELLER, M. Epigenetic Gene Silencing in Cancer: The DNA Hipermethylome. **Human Molecular Genetics**, n. 16, p. 50-59, 2007.

FABIAN, C.J. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. **Internacional Journal of Clinical Practice**, v. 12, n. 61, 2051-2063, 2007.

FARIA, J. L. **Patologia especial com complicações clínicas**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

FENG, W.; SHEN, L.; WEN, S.; ROSEN, D. G.; JELINEK, J.; HU, X.; HUAN, S.; HUANG, M.; LIU, J.; SAHIN, A. A.; HUNT, K. K.; BAST JR, R. C, SHEN, Y.; ISSA, J. P.; YU, Y. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. R57, 2007.

FERGUSON A.T.; LAPIDUS R.G.; BAYLIN S.B.; DAVIDSON N.E. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. **Câncer Research**, v. 55, n. 11, p. 2279-2283, 1995.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FUQUA, S. A.; FITZGERALD, S. D.; CHAMNESS, G. C. *et al*: Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. **Cancer Research**, n. 51, p. 105-109, 1991.

GESTER, H. B-carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 3, p.155-68, 1995.

GIACINTI, L.; CLAUDIO, P. P.; LOPEZ, M; GIORDANO, A. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast câncer. **The Oncologist**, v.1, n. 11, p. 1-8, 2006.

GRAHAM, J. D.; ROMAN, S. D.; MCGOWAN, E.; SUTHERLAND, R. L.; CLARKE, C. L. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n. 51, p. 30693–30700, 1995.

GROSS, G. E.; CLARK, G. M.; CHAMNESS, G. C.; McGUIRE, W. L. Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 44, n. 2, p. 836 – 840, 1984.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**. V. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HASEBE, T.; IMOTO, S.; YOKOSE, T.; ISHII, G. I.; IWASAKI, M.; WADA, N. Histopathologic factors significantly associated with initial organ-specific metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study. **Human Pathology**, v. 34, n. 5, p. 681–693, 2008.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **The Oncologist**, v. 11, n. 6, p. 541-552, 2006.

HERMAN J.G., GRAFF J.R., MYÖHÄNEN S., NELKIN B.D., BAYLIN S. Methylation-Specific PCR: A Novel PCR Assay for Methylation Status o CpG Islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HOPP, T. A.; WEISS, H. L.; HILSENBECK, S. G.; CUI, Y.; ALLRED, D. C.; HORWITZ, K. B.; FUQUA, S. A. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 2751-2760, 2004.

HUDZIAK, R. M.; LEWIS, G. D.; WINGET, M.; FENDLY, B. M.; SHEPARD, H. M.; ULLRICH, A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. **Molecular and Cellular Biology**. V. 9, n. 3, p. 1165–1172, 1989.

IKEDA, K ; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 7, p. 435-442, 2004.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2006 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> [08 Jan 2007]

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**. V. 22, n. 42, p. 6479-6483, 2003.

JERÓNIMO, C.; USADEL, H.; HERIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.G.; SIDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 Methylation in Non-neoplastic Prostatic Tissue and Organ-confined Prostate Adenocarcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.93, n.22, 1747-1752, 2001.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n. 6, p. 415-428, jun. 2002.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 2, n. 2, 89–97, 2006.

LACHNER M., JENUWEIN T. The many faces of histone lysine methylation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.14, n. 3, p. 286-298, 2002.

LANGE C.A. Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. **Steroids**, doi:10.1016, 2008.

LAPIDUS, R. G, FERGUSON, A. T.; OTTAVIANO, Y. L.; PARL, F. F.; SMITH, H. S.; WEITZMAN, S. A.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J. P.; DAVIDSON, N. E. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 805-810, 1996.

LAPIDUS, R. G.; NASS, S. J.; DAVIDSON, N. E. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, n. 1, p. 85–94, 1998.

LIU, Z. J.; MAEKAWA, M.; HORII, T.; MORITA, M. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ERa gene in tumor cell lines. **Life Sciences**, v. 73, n. 15, p. 1963–1972, 2003.

LIU, Z. J.; ZHANG, X. B.; ZHANG, Y.; YANG, X. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Letters**, v. 567, n. 2-3, p. 327-332, 2004.

LUCZAK, M. W.; JAGODZINSKI P .P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochemica et Cytobiological**, v. 44, n. 3, p. 143-154, 2006.

MENKE, C.H.; BIAZÚS, J. V.; XAVIER, N. L.; CAVALHEIRO, J. A.; RABIN, E. G.; BITTELBRUNN, A.; CERICATTO, R. **Rotinas em Mastologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, pp 149-155, 2007.

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

MOMPARLER, R.L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, p. 6479-6483, 2003.

OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R.; ARPINO, G.; LEE, A. S.; HILSENBECK, V. G.; Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. **Breast**, v. 14, n. 6, p. 458-65, 2005.

PAGE, D. L.; ANDERSON, T. J. Diagnostic histopathology of the breast cancer. New York: Churchill Livingstone, 1987.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

ROSE, P.G. Endometrial carcinoma. The New England **Journal of Medicine**, v. 335, v. 9, p. 640-649, 1996.

ROUSSEAU-MERCK, M.F.; MISRAHI, M.; LOOSFELT, H.; MILGROM, E.; BERGER R. Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. **Human Genetics**, v. 77, n. 3, p. 280-282, 1987

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANGUINETTI, C. J. ; NETO, D. E.; Neto ED, Dias-Neto, E, Diasneto E ; Simpson, A. J. Recovery and reamplification of PCR products from silver stained polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 1994.

SARTORIUS C. A.; MELLVILLE M. Y.; HOVLAND A. R.; TUNG, L.; TAKIMOTO, G. S.; HORWITZ, K. B. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 10, p. 1347-1360, 1994.

SASAKI, M.; DHARIA, A.; OH, B. R.; TANAKA, Y.; FUJIMOTO, S.; DAHIYA, R. Progesterone Receptor B Gene Inactivation and CpG Hypermethylation in Human Uterine Endometrial Cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 97-102, 2001.

SASAKI M.; TANAKA Y.; PERINCHERY G.; DHARIA A.; KOTCHERGUINA I.; FUJIMOTO S.; DAHIYA R. Methylation and Inactivation of Estrogen, Progesterone, and Androgen Receptors in Prostate Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 5, 2002.

SCHIFF R., MASSARWEH S., A., BHAEWANI J.S.L., ARPINO G., OSBORNE M.R.C.K. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, V. 56, P. 10-20, 2005.

SINGH, A.; ALI, S.; KOTHARI, M. S.; DE BELLA, M. T.; SMITH, C.; TIMMS, E. *et al.* Reporter gene assay demonstrates functional differences in estrogen receptor activity in purified breast cancer cells: a pilot study. **Internacional Journal of Cancer**, v. 107, n. 5, p. 700 – 706, 2003.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J.A.; WONG, S. G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULLRICH, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707-712, 1989.

STERN DF, HEFFERNAN PA, WEINBERG RA. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, p. 1729-1740, 1986.

TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 3740–3745, 2002.

VARMUS, H.; WEINBERG, R. A. Genes and the biology of cancer. New York: **Scientific American Library**, 1993.

VEGETO E., SHAHBAZ M.M., WEN D.X., GOLDMAN M.E., O'MALLEY B.W., McDONNELL D.P. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Molecular Endocrinology**, v.7, n. 10, p.1244-1255, 1993.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 12, p. 755-763, 2002.

VIANA, L. C.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Ginecologia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

WIDSCHWENDTER, M.; JONES, P. A. DNA methylation and breast carcinogenesis. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5462-5482, 2002. a

WIDSCHWENDTER, M.; JONES, P.A. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 1, p. 17–21, 2002. b

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N. E. DNA methylation in breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 8, n. 2, p.115-127, 2001.

**ANEXOS**

ANEXO 1.....	46
ANEXO 2.....	47
ANEXO 3.....	50
ANEXO 4.....	51

## ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). 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, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

## ANEXO 2 - ESTADIAMENTO CLÍNICO

Para nortear as ações de saúde no câncer da mama, uniformizando as condutas, foram criados critérios de estadiamento. Esses critérios procuram estabelecer uma relação entre a doença e o seu prognóstico e, para isso, os casos são colocados em grupos, estadiados de I a IV, formando uma hierarquia importante para o médico que trata de câncer de mama. A União Internacional Contra o Câncer (UICC), a partir dos anos 60, introduziu o sistema TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*, em inglês) e periodicamente o vem revisando, a fim de incorporar os avanços no prognóstico e no tratamento da neoplasia. Outras classificações foram propostas, como o ABCD de Haagensen, que foi bastante usada nas décadas de 60 e 70, e a da American Joint Committee on Cancer (AJCC). Esta última acabou se fundindo com a classificação da UICC e passou a ser padrão no mundo inteiro.

### CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA - TNM

Baseia-se no diâmetro máximo do tumor (T), na presença ou não de linfonodos metastáticos na axila (N) e nas metástases à distância, ausentes ou não (M). Para fins de orientação, transcrevemos a classificação da UICC, 6ª edição, publicada em 2003. Essa nova classificação trouxe em seu bojo os recentes conhecimentos adquiridos com a padronização da técnica do linfonodo sentinela, como o conceito de micrometástases e de células tumorais isoladas, incluindo, também, o modo de detecção destas, se por imuno-histoquímica ou por métodos moleculares. Considerando a classificação da UICC, são estabelecidos grupos por estadio, constituindo a classificação clínica. Ela só se aplica a carcinomas e a tumores primários, virgens de tratamento.

### Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC), 2003

cT	Tumor primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Doença de Paget da papila sem tumor associado
T1	Tumor menor ou igual a 2 cm
	T1mic Carcinoma microinvasor
	T1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm
	T1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm
	T1c Tumor maior que 1cm e menor ou igual a 2 cm
T2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
T3	Tumor maior que 5 cm
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para
	T4a Parede torácica
	T4b Edema ou ulceração da pele
	T4c 4a + 4b
	T4d Carcinoma inflamatório

**Obs.:** Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculo serrátil anterior, mas não o músculo peitoral. Doença de Paget associada a tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

### cN Linfonodos regionais

Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2	
	N2a Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes
	N2b Metástase clinicamente aparente na mamária interna na ausência de metástase axilar

N3	N3a	Metástase para linfonodo infraclavicular
	N3b	Metástase para linfonodo da mama interna e axilar
	N3c	Metástase para linfonodo supraclavicular
<b>cM</b>	<b>Metástase à distância</b>	
	Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase à distância
	M1	Presença de metástase à distância

#### Classificação patológica (pTNM) 6ª edição (UICC)

pT	Tumor primário
pTx	Tumor primário não pode ser avaliado
pT0	Não há evidência de tumor primário
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Doença de Paget do mamilo sem tumor associado*
pT1	Tumor menor ou igual a 2 cm pT1mic Carcinoma microinvasor pT1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm pT1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm pT1c Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm
pT2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
pT3	Tumor maior que 5 cm
pT4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para pT4a Parede torácica pT4b Edema ou ulceração da pele pT4c 4a + 4b

\*Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho da lesão.

#### pN Linfonodos regionais

pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
pN0	(i -/+)**
pN0	(MOL -/+)**
pN1	pN1mi Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm) em axila ou CMI pN1a 1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm pN1b Linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente pN1c 1 a 3 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm e linfonodos da mama interna com metástase microscópica sem linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente
pN2	pN2a 4 a 9 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm pN2b Linfonodos da mama interna clinicamente aparentes na ausência de comprometimento axilar
pN3	pN3a 10 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm ou -- Linfonodo infraclavicular ipsilateral comprometido pN3b Linfonodos da mama interna clinicamente comprometidos na presença de comprometimento de linfonodos axilares ou -- Mais de 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente pN3c Linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral comprometido

\*\* Casos em que a metástase linfonodal consiste em apenas células tumorais isoladas ou formando agrupamentos menores que 0,2 mm, que, em sua maioria, são detectados pela imunohistoquímica (i)

ou por biologia molecular (MOL), são classificados como pN0, pois tipicamente não mostram evidência de atividade metastática.

**pM Metástase a distância**

pMx	Metástase à distância não pode ser avaliada
pM0	Ausência de metástase à distância
pM1	Presença de metástase à distância

**Resumo**

	<i>Classificação por estadios</i>		
Estadio 0 Tis	N0 M0	Estadio IIIA	T0 N2 M0
Estadio I T1*	N0 M0		T1* N2 M0
Estadio IIA	T0 N1 M0		T2 N2 M0
	T1* N1 M0		T3 N1, N2 M0
Estadio IIB	T2 N0 M0	Estadio IIIB	T4 N0,N1, N2, M0
	T2 N1 M0	Estadio IIIC	Qualquer T N3 M0
	T3 N0 M0	Estadio IV	Qualquer T, Qualquer N M1

\*T1 inclui T1 mic.

**GRAU TUMORAL (SBR)**

O estadiamento tumoral, especialmente quando realizado por patologistas treinados, correlaciona-se bem com o prognóstico clínico. Os sistemas de estadiamento mais utilizados para o câncer de mama são a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), o qual foi modificado pelo grupo de Nottingham.

O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares ou papilares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. O índice mitótico avalia o número de mitoses encontrados na amostra do tumor. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (fracamente diferenciado). Pacientes com um escore de SBR de 3 apresentam um risco relativo de 4,4 comparado com aquelas com um escore de SBR de 1 para tempo livre de doença por cinco anos.

O grau histológico é aplicável a todos os carcinomas mamários. Ele tende a aumentar junto com o tamanho tumoral e o acometimento linfonodal, com importante influência negativa no prognóstico.

**FONTE:** MENKE *et al.*, 2007.



**ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA**

Nº amostra	Fibro-adenoma	Idade Paciente	Tamanho (mm)	linfonodos	RE	RP	Expressão da prot. RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP M
1	CP163	44	12	-	nd	nd	X	nd	nd	-	-	-	+
2	CP179	18	48	nd	nd	nd	X	nd	nd	+	-	-	-
3	CP235	15	28	-	nd	nd	X	nd	nd	-	-	-	-
Nº amostra	CD 'in situ'	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP M	
4	CP025	79	Tis	nd	nd	nd	X	0	nd	nd	nd	-	-
Nº amostra	CDI GI	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M	
5	CP162	49	T1	-	+	+	P30	I	-	-	-	+	
6	CP287	83	T1	-	+	+	P50	I	-	-	-	-	
7	CP323	50	T2	-	+	nd	nd	IIA	-	-	-	+	
8	CP332	30	T2	-	+	+	P30	IIA	-	-	-	+	
9	CP402	68	T2	+	+	+	P30	IIIB	-	-	-	+	
10	CP408	60	T2	-	+	+	P30	IIA	-	-	-	+	
11	CP425	72	T2	-	+	+	P50	IIA	-	-	-	-	
12	CP456	75	T1	-	+	+	p>30	I	-	-	-	-	
13	CP460	66	T1	-	+	+	P10-30	I	-	-	-	+	
14	CP471	52	T2	+	+	+	P10	IIIB	-	-	-	-	
15	CP515	63	T1	-	+	+	P10-30	I	-	-	-	+	
16	CP528	42	T1	-	+	+	P80	I	-	-	-	+	

**Continua...**

**ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA**

Nº amostra	CDI GII	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	Expressão da prof. RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M
17	CP172	68	T2	+	+	+	p>30	-	IV	-	+	+	-
18	CP174	51	T3	+	+	+	P40	+	IV	-	+	+	+
19	CP197	66	T1	+	-	-	N	+	IIA	-	-	-	+
20	CP271	47	T2	+	+	nd	X	-	IIB	-	-	+	+
21	CP290	71	T1	nd	+	nd	nd	-	pT1,pNX,pMx	-	-	-	+
22	CP314	74	T2	-	+	+	P10	+	IIA	-	-	-	+
23	CP337	62	T2	-	+	+	P80	-	IV	-	+	+	+
24	CP341	73	T2	+	+	+	P50	-	IIB	-	-	-	-
25	CP365	39	T2	+	+	-	N	-	IIB	-	-	-	+
26	CP366	63	T2	-	+	-	N	+	IIA	-	-	-	-
27	CP413	83	T2	+	+	+	P10-30	-	IIB	-	-	-	-
28	CP487	68	T1	-	+	+	P10-30	-	I	-	-	-	-
29	CP497	45	T1	+	+	+	p>30	-	IV	-	+	-	+
30	CP520	71	T4	+	+	+	P10	+	IIIC	-	-	-	+
31	CP527	53	T2	+	-	-	N	+	IIIA	-	-	-	+
32	CP532	56	T2	+	+	+	P70-80	-	IIIC	-	-	-	-
33	CP536	40	T2	+	+	+	P50	+	IIIC	-	-	-	-
34	CP542	40	T2	+	+	+	P50	+	IIA	-	-	-	+
35	CP547	54	T2	+	+	+	P30-50	-	IIIA	-	-	-	-
36	CP556	63	T2	-	+	+	P50	-	IIA	-	-	-	+

**Continua...**

**ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA**

Nº amostra	CP	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	Expressão da prot. RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M
37	CP562	49	T2	+	+	+	P50	+	IIIA	-	-	-	+
38	CP427	55	T1	+	+	+	X	+	IV	-	+	nd	+
39	CP243	48	T4	+	+	+	X	-	IIIB	nd	+	+	+
40	CP310	56	T1	+	+	+	X	+	IIA	-	-	-	+
41	CP338	44	T2	-	-	-	N	-	IIA	-	-	-	+
42	CP399	82	T2	+	+	+	P10	-	IIIB	-	-	-	-
43	CP422	75	T4	-	+	+	p>30	-	IV	+	+	+	-
44	CP424	63	T2	+	+	-	N	-	IIIB	-	-	-	-
45	CP432	66	T4	+	+	+	P10-30	-	IIIB	-	-	-	+
46	CP434	59	T2	+	-	-	N	-	IV	-	+	+	+
47	CP470	67	T2	-	+	+	p>30	-	IIA	-	-	-	+
48	CP505	72	T4	+	-	-	N	+	IV	+	+	+	-
49	CP525	45	T3	+	+	+	P10	-	IIIA	-	-	-	+
50	CP537	69	T2	-	-	-	N	+	IIIB	+	-	-	+
51	CP539	55	T1	+	-	-	N	+	IIA	-	-	-	-
52	CP545	27	T3	-	-	-	N	-	IIIB	-	-	-	+
53	CP558	51	T1	-	+	+	P50	+	I	-	-	-	-
54	CP559	79	T2	-	-	-	N	+	IV	-	+	+	+
55	CP430	54	T4	+	-	nd	X	nd	IIIB	-	-	-	+

**Continua...**

**ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA**

Nº amostra	CLI GI	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	Expressão da prot. PR	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M
56	CP319	68	T2	-	+	+	p>30	-	IIA	-	-	-	+
57	CP389	84	T2	-	nd	nd	X	nd	IIA	-	-	-	+
58	CP476	71	T3	+	+	nd	X	nd	nd	nd	nd	nd	+
59	CP485	59	T1	-	+	+	P10-30	-	I	-	-	-	+
60	CP501	53	T1	-	+	+	p>30	-	I	-	-	-	+
61	CP300	65	T1	-	+	+	X	-	I	+	-	-	-
62	CP339	53	T2	+	+	nd	P10	-	IIIB	-	+	+	-
Nº amostra	CLI GII	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	Expressão da prot. RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M
63	CP256	55	T2	+	+	+	P80	-	IIIB	-	-	-	+
64	CP390	44	T1	-	+	+	P10-30	-	I	-	-	-	+
65	CP420	52	T2	-	+	+	P10	-	IIA	-	-	-	+
66	CP445	46	T3	+	+	+	p>50	-	IIIA	-	-	-	+
67	CP506	55	T3	+	+	+	p>30	-	IV	-	+	+	+
68	CP535	79	T1	-	+	-	N	-	I	-	-	-	+
69	CP297	76	T3	-	+	+	X	-	IIA	+	nd	nd	+
70	CP412	42	T2	-	+	nd	X	-	IIA	-	-	-	-
71	CP574	45	T2	+	-	-	X	-	nd	-	-	-	-
72	CP585	66	T2	+	+	-	X	-	IIIB	-	-	-	+
73	CP529	46	T3	-	+	+	P5-10	+	IIIA	-	-	-	+

Continua...

**ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA**

Nº amostra	CLI GIII/nd	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	Expressão da prot. RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP M
74	CP202	55	T2	+	+	nd	X	nd	IIB	-	-	-	+
75	CP196/nd	77	T4	-	-	nd	X	+	IIB	+	+	+	-
76	CP340/nd	55	T2	+	nd	nd	X	nd	IIB	nd	nd	nd	-

**Legenda:** CD: CARCINOMA DUCTAL; CDI CARCINOMA DUCTAL INVASIVO; CLI: CARCINOMA LOBULAR INVASIVO; G: GRAU HISTOLÓGICO (SBR); CP: NÚMERO DO CADASTRO DO PACIENTE NO BANCO DE TUMORES; RE: RECEPTOR DE ESTRÓGENO; RP: RECEPTOR DE PROGESTERONA; ERBB2-RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO ERBB2; MSPM: TUMOR METILADO.