

**SAVANA CAMILLA DE LIMA SANTOS**

**DETECÇÃO, POR HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA, DE  
ANORMALIDADES GENÉTICAS EM TUMORES PRIMÁRIOS DE  
MAMA E EM METÁSTASES NOS LINFONODOS SENTINELA  
CORRESPONDENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Iglênir João Cavalli

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze M. S. F. Ribeiro

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciane Regina Cavalli

**CURITIBA  
2007**

Às pacientes, que esperam que frutos de trabalhos como este possam refletir uma expectativa de vida melhor em um futuro próximo.

Aos meus pais, Neuci e Djalma, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e seus familiares pela doação do material utilizado nesse trabalho.

Ao Professor Iglénir João Cavalli, não só pela orientação científica e pela contribuição que tem dado para minha formação profissional ao longo de todos esses anos, mas também pela paciência, carinho e compreensão que tornaram a realização desta tese uma caminhada muito mais confortável para se seguir.

À Enilze Ribeiro, pela amizade, carinho, paciência, orientação profissional e pessoal e por todos os ensinamentos que serão levados comigo por toda minha vida. Sua participação nesse trabalho foi muito maior do que a de co-orientadora, foi a de uma amiga e de uma mãe ("Mammy"), não apenas me orientando, mas também confortando, aconselhando e mostrando da forma mais sincera a realidade da carreira científica.

À Luciane Cavalli e Bassem Haddad, pela oportunidade de realizar a parte experimental em seu laboratório na Universidade de Georgetown, por possibilitar meu engrandecimento profissional e pessoal decorrente das dificuldades e experiências vividas ao estar longe de minha família e amigos, e por todas as críticas e sugestões que tornaram a realização desse trabalho possível.

Aos meus pais, Djalma e Neuci, que estiveram e estão ao meu lado nos melhores e nos piores momentos da minha vida, e principalmente nos três anos de realização da tese. Por estarem mais presentes do que nunca no momento em que estive mais longe, me apoiando, incentivando e encorajando, e por me

ajudarem a superar e a passar por cada dificuldade encontrada ao longo dessa realização.

Ao meu irmão, Rodrigo, que embora longe fisicamente, sempre está perto do meu coração.

Aos meus familiares, pela admiração e respeito.

Às amigas Daniela, Luciana, Magali, Marília, Rosana e Thais, pela amizade indescritível conquistada e concretizada em anos de convivência. Pelo carinho, apoio, admiração, respeito e presença nos momentos em que mais precisei, e por me mostrarem a cada dia, cada mês e a cada ano o sentido da verdadeira amizade.

Às amigas queridas Cláudia e Pabline, que tornaram meu tempo de "exílio" em Washington, DC, muito mais feliz. Pela amizade intensa e sincera que me permite chamá-las de irmãs, pelo apoio, amor e dedicação que me fazem senti-las tão presentes mesmo estando tão distantes, e por fazerem da nossa amizade algo que será levado comigo por toda minha vida.

Às amigas Fernanda e Loraine, por terem me surpreendido com sua amizade em uma das fases mais difíceis enfrentadas por mim e por compartilharem as frustrações, alegrias, angústias e conquistas durante a realização e finalização deste trabalho.

Ao querido amigo Homer, por me fazer ter orgulho de mim mesma, pela admiração incondicional, pelo incentivo na carreira científica, por me fazer acreditar na minha capacidade e pelo carinho imenso.

Aos queridos Dani Quadrini e Edu Bahia por fazerem parte da minha vida de maneira tão positiva e alegre.

Ao Rodrigo Godoy, não só pela ajuda com os gráficos, mas também pela parceria em diversos momentos, admiração, força e por acreditar no meu potencial.

À equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, da qual faço parte há 9 anos, pelo companheirismo e principalmente à Roberta pela amizade e confiança.

À Professora Maria da Graça Bicalho e à equipe do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), pela força e compreensão dadas durante e, principalmente, na finalização deste estudo.

Ao Dr. Rubens S. de Lima e Cícero Urban pelo encaminhamento das amostras analisadas.

Aos professores e ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, que em sua maioria apoiou o desenvolvimento dessa tese.

E a todos, que de uma forma ou de outra, participaram de forma positiva na realização deste projeto pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>04</b>
2.1. Câncer de Mama: Epidemiologia e Progressão Tumoral .....	06
2.2. Linfonodos Axilares e Sentinela no Prognóstico do Câncer de Mama .....	08
2.3. Alterações Genéticas em Amostras Pareadas de Tumores Primários e Metastáticos .....	16
2.4. Alterações Epigenéticas no Câncer de Mama .....	20
2.5. Hibridização Genômica Comparativa (CGH) .....	22
2.6. Objetivos .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. Caracterização da Amostra .....	27
3.2. Procedimentos Técnicos .....	28
3.2.1. Microdissecção Celular e Extração de DNA .....	28
3.2.2. Hibridização Genômica Comparativa (CGH) .....	29
3.3. Obtenção das Imagens .....	31
3.4. Análise das Imagens .....	31
3.5. Análise Estatística .....	34
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
5.1. Alterações Cromossômicas Frequentes em Tumores Primários .....	63

5.2. Alterações Cromossômicas Frequentes em Linfonodos Sentinela .....	72
5.3. Comparação dos Resultados em Tumores Primários e Linfonodos Sentinela Correspondentes .....	75
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTÁGIOS HISTOPATOLÓGICOS DA TUMORIGÊNESE MAMÁRIA .....	07
FIGURA 2 - LINFONODOS ADJACENTES À ÁREA DA MAMA .....	10
FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO DE LINFONODOS SENTINELA MAMÁRIOS .....	12
FIGURA 4(a) - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH) .....	25
FIGURA 4(b) - RESULTADO OBTIDO APÓS ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM COM VISUALIZAÇÃO DE PERDAS E GANHOS DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS .....	25
FIGURA 5(a) - PERFIL DE CGH DO CASO 1, TUMOR PRIMÁRIO .....	32
FIGURA 5(b) - PERFIL DE CGH DO CASO 1, LINFONODO SENTINELA .....	33

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. NÚMERO DE GANHOS ENCONTRADOS NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NOS SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CASO..... 50

GRÁFICO 2. NÚMERO DE PERDAS ENCONTRADAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NOS SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CASO ..... 50

GRÁFICO 3. NÚMERO TOTAL DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ENCONTRADAS EM TUMORES PRIMÁRIOS E SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CASO ..... 51

GRÁFICO 4. NÚMERO DE GANHOS ENCONTRADOS NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NOS SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CROMOSSOMO ..... 51

GRÁFICO 5. NÚMERO DE PERDAS ENCONTRADAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NOS SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CROMOSSOMO ..... 52

GRÁFICO 6. NÚMERO TOTAL DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ENCONTRADAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NOS SEUS LINFONODOS SENTINELA CORRESPONDENTES POR CROMOSSOMO ..... 52

GRÁFICO 7. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE GANHOS DE ACORDO COM OS RESULTADOS DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO EM TUMORES PRIMÁRIOS E EM METÁSTASES NOS LINFONODOS SENTINELA POR CROMOSSOMO..... 54

GRÁFICO 8. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE PERDAS DE ACORDO COM OS RESULTADOS DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO EM TUMORES PRIMÁRIOS E EM METÁSTASES NOS LINFONODOS SENTINELA POR CROMOSSOMO ..... 54

GRÁFICO 9. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS (GANHOS + PERDAS) DE ACORDO COM OS RESULTADOS DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO EM TUMORES PRIMÁRIOS E EM METÁSTASES NOS LINFONODOS SENTINELA POR CROMOSSOMO ..... 55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES .....	28
TABELA 2. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS NOS TUMORES PRIMÁRIOS.....	37
TABELA 3. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS NOS LINFONODOS SENTINELA .....	39
TABELA 4. FREQUÊNCIAS, ABSOLUTA E RELATIVA, DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM TUMORES PRIMÁRIOS POR CASO .....	41
TABELA 5. FREQUÊNCIAS, ABSOLUTA E RELATIVA, DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM TUMORES PRIMÁRIOS POR CROMOSSOMO .....	42
TABELA 6. FREQUÊNCIAS, ABSOLUTA E RELATIVA, DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFONODOS SENTINELA POR CASO .....	44
TABELA 7. FREQUÊNCIAS, ABSOLUTA E RELATIVA, DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINFONODO SENTINELA POR CROMOSSOMO .....	45
TABELA 8. MÉDIAS DE GANHOS (N=144 E 76) E PERDAS (N=108 E 80) CROMOSSÔMICAS POR CASO E POR CROMOSSOMO NOS TUMORES PRIMÁRIOS (A) E NOS LINFONODOS SENTINELA (B), RESPECTIVAMENTE .....	47
TABELA 9. ALTERAÇÕES COMPARTILHADAS ENTRE OS TUMORES PRIMÁRIOS E LINFONODOS SENTINELA .....	56
TABELA 10. NÚMERO E FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS COMPARTILHADAS E NÃO COMPARTILHADAS ENTRE TUMORES PRIMÁRIOS E LINFONODOS SENTINELA POR CASO .....	58
TABELA 11. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ISOLADAS .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIB – Amplificado em Câncer de Mama  
APC – *adenomatous polyposis of the colon*  
BCL7C - *b-cell cl/lymphoma 7C*  
BRCA2 – gene associado ao câncer de mama 2  
BTAK – quinase amplificada em câncer de mama  
CAG – gene associado ao cancer  
CDH1 – caderina 1  
CEA – *carcinoembryonic antigen*  
CGH – Hibridização Genômica Comparativa  
CK19 – cytocheratin 19  
E-CAD – e-caderina  
ERBB2 - *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*  
FISH – Hibridização *In Situ* por Fluorescência  
FITC – isotiacianato fluorescente  
FMO2 - *flavin-containing monooxygenase 2*  
FUS – *fusion*  
GSTP1 – glutationa transferase P1  
HE – hematoxilina & eosina  
HIVEP2 - *human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 2*  
hMAM-A – mamaglobina A humana  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
LCM – *laser capture microdissection*  
LS – Linfonodo Sentinela  
MAGE–A3 – antígeno A3 associado ao melanoma  
MAM – mamaglobina  
MAMB – mamaglobina B  
MS – Ministério da Saúde  
MUC1 – *mucin 1*  
NABC1 – *novel amplified in breast cancer 1*  
NF-KB - *nuclear factor kappa-b*  
NRAS - *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PIP – *prolactin-inducible protein*  
PTGS2 - *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*  
PTP1B – *protein tyrosine phosphatase 1B*  
RAI - *retinoic acid-induced gene*  
RNAm – RNA mensageiro  
RT-PCR – PCR por Transcriptase Reversa  
SASH1 - *sterile alpha motifs- and sh3 domain-containing protein 1*  
SNP – polimorfismo em um único nucleotídeo  
THBS2 – *thrombospondin 2*

TP – Tumor Primário

TRITC – isotiacianato tetrametilrodamina fluorescente

ZNF217 – *zinc finger protein 217*

## RESUMO

O desenvolvimento e a progressão do câncer de mama são conseqüências do acúmulo de alterações genéticas que podem resultar na perda do controle da proliferação de células epiteliais, invasão de tecidos e inibição da apoptose. Porém, pouco se sabe, atualmente, sobre as alterações específicas que ocorrem durante o processo metastático. A identificação de regiões/genes envolvidos associados com a progressão do câncer de mama é de grande importância para a compreensão do comportamento biológico e molecular do processo carcinogênico. Neste estudo, analisamos tumores primários e metástase em linfonodos sentinela correspondentes para determinar alterações genéticas específicas que estão presentes nestas lesões. Vinte tumores primários (TP) de mama e seus linfonodos sentinela (LS) correspondentes foram analisados por Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Nos TP, as alterações cromossômicas observadas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados. As freqüências de alterações cromossômicas observadas por caso variaram de 1,8% a 10,5%. Foi observado ainda, que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os cromossomos, variando de 1,4% a 11%, sendo que os cromossomos 1, 20 e 16 apresentaram o maior número de alterações. Nos LS, assim como nos TP, as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos e as freqüências de alteração cromossômica observadas por caso variaram de 1,1% a 13,3%. As alterações cromossômicas também não se distribuíram ao acaso entre os cromossomos, variando de 1,1% a 12,2%, sendo que os cromossomos 1, 6 e 19 apresentaram o maior número de alterações. O número total de alterações cromossômicas observadas nos TP (220) foi aparentemente maior do que nas metástases em LS (188), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em 15 dos 20 (75%) casos analisados neste estudo, foi observada pelo menos uma alteração cromossômica em comum entre as amostras pareadas. Nos cinco casos restantes, as alterações diferiram completamente entre si. As alterações mais comuns encontradas em ambos os grupos estudados foram ganhos nos cromossomos 19, 16, 1p32~pter, 20, 17, 12q23~qter, 1q22~pter, 1q22~qter, 18p e perdas em 13q13~32, 6q13~q23, 2q22~q34. Neste estudo, foram observadas alterações cromossômicas ocorrendo preferencialmente em regiões cromossômicas específicas em ambas as lesões analisadas. Estas regiões devem ser melhor investigadas usando metodologias de maior resolução para caracterizar com maior precisão possíveis genes candidatos localizados nas mesmas, as quais podem apresentar um papel relevante no câncer de mama. Finalmente, um número maior de estudos em metástases em LS será importante para corroborar nossos achados e para caracterizar geneticamente estas lesões, fortalecendo a importância da biópsia de LS no estadiamento tumoral e prognóstico de pacientes com câncer de mama.

## ABSTRACT

Breast tumor development and progression are driven by an accumulation of genetic alterations that may result in loss of the cell proliferation control, tissues invasion and apoptosis inhibition. However, little is known about specific genetic changes that occur during this process. The identification of chromosomal regions/genes associated with each step in the breast cancer progression is important to understand the biological and molecular behavior of mammary carcinogenesis, and can ultimately contribute to prognosis and be used as potential targets for treatment. In this study we have analyzed primary breast tumors and their corresponding metastatic sites to determine specific genetic alterations that are present in each of these lesions. Twenty paired primary breast tumors (PT) and their matched sentinel lymph nodes (SLN) were investigated for DNA copy number changes or chromosomal changes, by Comparative Genomic Hybridization (CGH), a wide genome molecular cytogenetic methodology. In the PT, we observed a non-random involvement of chromosomal changes among the cases analyzed. The frequencies of chromosome alteration observed per case varied from 1.8% to 10.5%. Also, we found that the chromosomal changes did not occur randomly among the chromosomes, and chromosomes 1, 20 and 16 were the ones with higher number of changes. In the SLN, as we have observed for the PT, the chromosomal changes found did not occur randomly among the cases and the frequencies of chromosome alteration observed per case ranged from 1.1% to 13.1%. Chromosomal changes also did not occur randomly among the chromosomes and affected preferentially the chromosomes 1, 6 and 19. The total number of alterations detected in PT (220) was apparently higher than the one observed in SLN (188), however this difference did not reach statistic significance. In 15 of the 20 (75%) cases there was at least one chromosomal change common to both the PT and the SLN analyzed, whereas the alterations in the other 5 pairs of lesions differed completely between them. The most frequent changes present at both lesions were gains of 19, 16, 1p32~pter, 20, 17, 12q23~qter, 1q22~pter, 1q22~qter, 18p and losses of 13q13~32, 6q13~q23, 2q22~q34. In conclusion, we observed non-random alterations in specific chromosome regions in both of the tumor lesions analyzed in this study. These regions should certainly be further investigated, using higher resolution methodologies in order to accurately characterize the potential candidate genes located at these sites, which may present a relevant role in breast cancer. Finally, additional studies in SLN are of importance in order to support the recurrence of our findings and to genetically characterize these lesions, strengthening the role of the SLN biopsy in the tumor staging and prognosis of breast cancer patients.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a segunda causa de morte por neoplasias nos Estados Unidos, sendo a principal causa de morte entre mulheres de 40 a 60 anos de idade (GARNE et al., 1997). Estima-se que o cada ano ocorram 999 mil novos casos e 375 mil mortes no mundo devidas a essa doença (PARKIN et al., 2001). Para o ano de 2006, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) estimou que 472.050 novos casos de câncer ocorreriam no Brasil, com o câncer de mama sendo o segundo mais incidente na população feminina, responsável por 48.930 novos casos. Para o Estado do Paraná e para a cidade de Curitiba, foi estimado que em 2006 ocorreriam, respectivamente, 2.970 e 700 novos casos de câncer de mama (MS/INCA, 2006).

O prognóstico do câncer de mama é baseado, atualmente, em parâmetros histológicos e clínicos, tais como presença ou ausência de linfonodos axilares metastáticos, tipo e tamanho do tumor, presença ou ausência de receptores hormonais (para estrógeno e para progesterona) e amplificação do gene *ERBB2*.

Destes, a caracterização dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais eficaz (LINDAHL et al., 2000), sendo que a presença de metástase nestes linfonodos confere um alto risco de recorrência da doença (HERMSEN et al., 1998). No entanto, a análise de linfonodos axilares como método de estadiamento resulta em uma alta taxa de morbidade (REINTGEN et al. 2000; SAKORAFAS et al., 2000) e mais da metade das pacientes submetidas a este procedimento apresentam linfonodos livres de metástases, tendo sido, portanto, submetidas a complicações e riscos cirúrgicos desnecessários (GIULIANO et al., 1997). Além disso, cerca de 20 a 30% das pacientes com resultado negativo na análise de linfonodos apresentam

recidiva da doença entre cinco a 10 anos após o diagnóstico (KAMBY et al., 1991; HELLMAN, 1994).

O desenvolvimento de métodos mais eficientes, que possibilitem a determinação do estadiamento dos linfonodos axilares em pacientes com câncer de mama, através de procedimentos pouco ou não invasivos, poderia evitar a dissecação axilar, diminuindo assim a morbidade gerada por esse procedimento e aumentando a sobrevida livre de doença do paciente (VERONESI et al., 1997).

Com este propósito, a técnica de biópsia do linfonodo sentinela tem sido empregada e aprimorada em várias instituições clínicas. O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo da drenagem linfática tumoral, o qual representa o primeiro sítio de metástase em câncer de mama. Se o exame patológico neste linfonodo indicar a ausência de metástases, pode-se admitir que metástases em linfonodos axilares mais distantes não estão presentes, e o tumor está possivelmente limitado ao seu sítio primário. Por outro lado, a detecção de células malignas no linfonodo sentinela é uma indicação para a retirada dos linfonodos axilares, processo denominado de esvaziamento axilar (GIULIANO, 1996; VERONESI et al., 1999; 2001).

Portanto, é necessária uma avaliação minuciosa deste linfonodo, para identificar a presença de células tumorais, principalmente quando estas estão presentes em frequências significantes, antes de se optar pelo procedimento de esvaziamento axilar. Além de métodos clássicos de avaliação por imunohistoquímica, outros métodos têm sido utilizados para a identificação de marcadores tumorais no linfonodo sentinela. Estes são na sua maioria baseados na análise por RT-PCR de genes envolvidos em metástases mamárias. Apesar de uma série de transcritos gênicos anormais (RNAm) terem sido identificados (ABDUK-RASOOL et al., 2006), este tipo de análise apresenta uma frequência alta de

resultados falso-positivos e nenhum dos marcadores de RNAm descritos até o momento podem ser utilizados separadamente ou em conjunto na decisão do esvaziamento axilar. Há, portanto, a necessidade de desenvolvimento de métodos genéticos mais sensíveis para a detecção de células malignas no linfonodo sentinela.

Neste trabalho foram avaliadas amostras pareadas de tumores primários de mama e de metástases nos linfonodos sentinelas da mesma paciente. Estas amostras foram analisadas utilizando-se a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH), a qual permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma com uma resolução de cerca de 5 a 10 Mb (KALLIONIEMI et al., 1992).

Até o presente, segundo o nosso conhecimento, existe somente um estudo na literatura onde este tipo de análise foi realizado no linfonodo sentinela de pacientes com câncer de mama (CAVALLI et al., 2003). A aplicação desta técnica em estudos comparativos entre tumores primários e os linfonodos sentinela correspondentes proporcionará uma análise de melhor resolução para a caracterização das anormalidades cromossômicas presentes nestas lesões tumorais possibilitando a identificação de alterações genéticas relacionadas ao processo inicial de metastização mamária diferenciando-as das que ocorrem nos sítios metastáticos mamários mais distantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os primeiros estudos com observações relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer datam de 1890, quando o patologista alemão David Von Hansemann (citado por MITELMAN, 2000) observou irregularidades nucleares e mitóticas estudando biópsias de carcinomas. Estas observações iniciais possibilitaram que, em 1914, Theodor Boveri (citado por MITELMAN, 2000) apresentasse a Teoria Clonal do Câncer que, basicamente, postulava que neoplasias malignas freqüentemente desenvolvem-se como um clone originado de uma célula cromossomicamente anormal. Porém, foi somente na década de 60 que os estudos das células neoplásicas começaram a evoluir e esta hipótese pode ser comprovada, constituindo-se como marco inicial, a descrição do cromossomo *Philadelphia* (Ph) nas leucemias mielóides crônicas (NOWELL e HUNGERFORD, 1960), o que confirmou a hipótese de Boveri.

As primeiras indicações de que as alterações cariotípicas nos tumores de tecidos sólidos, assim como nas doenças hematopoiéticas, não ocorriam ao acaso foram descritas por LEVAN (1966) e VAN STEENIS (1966), que independentemente, analisando formas ascíticas de tumores gástricos, mamários, uterinos e ovarianos, observaram que determinados cromossomos apareciam em número aumentado e outros faltavam de forma sistemática.

A partir da década de 70, com a introdução das técnicas de bandeamento dos cromossomos humanos (ZECH, 1969; CASPERSSON et al., 1970 a,b,c,d,e), a área da citogenética e câncer apresentou um notável desenvolvimento contribuindo de forma importante para o esclarecimento das aberrações cromossômicas envolvidas e para a formulação de novos conceitos sobre a etiologia genética do câncer.

Os métodos de genética e citogenética molecular, estes baseados na hibridização *in situ* por fluorescência, proporcionaram nas últimas décadas, um avanço no mapeamento de genes e determinaram uma resolução mais sofisticada na identificação de aberrações cromossômicas em neoplasias humanas. Nos últimos 25 anos, os estudos de citogenética clássica e molecular revelaram mais de 600 rearranjos cromossômicos balanceados associados a neoplasias, e atualmente, estão descritos cerca de 100 genes envolvidos em rearranjos que podem estar associados a doenças neoplásicas (MITELMAN, 2000). Entretanto, estes dados resultam, principalmente, do estudo de neoplasias hematopoiéticas, caracterizando uma desproporção quanto aos estudos citogenéticos em tumores de tecidos sólidos, que constituem menos de um terço dos realizados em cânceres humanos. Estes tumores, por outro lado, são os mais freqüentes no homem e responsáveis por uma importante morbidade e mortalidade da população mundial. O número limitado de estudos citogenéticos nos tumores de tecido sólido em relação aos hematopoiéticos se deve a vários fatores, incluindo os de origem metodológica: a obtenção e a qualidade dos cromossomos é, geralmente, insatisfatória, principalmente em neoplasias epiteliais; ao contrário das doenças hematopoiéticas, a maioria dos tumores de tecidos sólidos já tem, no diagnóstico, uma grande quantidade de aberrações cromossômicas adquiridas durante a progressão do tumor. Deste modo, mesmo quando a qualidade dos cromossomos é satisfatória e cada anormalidade pode ser caracterizada, a diferenciação entre aberrações primárias, patogenicamente essenciais, e aberrações evolutivamente secundárias é mais difícil de ser identificada em tumores de tecidos sólidos do que em neoplasias hematopoiéticas. Finalmente, um número crescente de tumores epiteliais, em

particular carcinomas de pâncreas, pele e mama, parece estar caracterizado por uma alta heterogeneidade cariotípica clonal (MITELMAN, 2000).

## **2.1. Câncer de Mama: Epidemiologia e Progressão Tumoral**

O câncer de mama é um dos cânceres humanos mais estudados, considerando que é, atualmente, a segunda causa de morte por neoplasias nos Estados Unidos, sendo a principal causa de morte entre mulheres de 40 a 60 anos de idade (GARNE et al., 1997). No Brasil, através de dados obtidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou-se para o ano de 2006 a ocorrência de 48.930 casos novos (incidência de 52/100.000). Foi estimado ainda, que uma em cada oito mulheres brasileiras desenvolverá algum tipo de câncer mamário. Dados deste Instituto informam também que em 70% das mulheres que apresentam esta doença o diagnóstico ocorre em estágio avançado, resultando, conseqüentemente, numa alta incidência de mortes. Tanto devido ao aumento do número de diagnósticos, como à melhoria da informação nos atestados de óbito, observou-se um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama entre mulheres, de 1979 a 2000, passando de 5,77/100.000 a 9,74/100.000, correspondendo a uma variação percentual relativa de 59% (MS/INCA, 2006).

Embora a causa seja desconhecida, vários fatores de risco parecem aumentar a susceptibilidade da mulher para o câncer de mama. Alguns desses fatores incluem a história menstrual e reprodutiva, história familiar, presença de doença benigna de mama, dieta, exposição à radiação ionizante e longo tratamento com estrógenos (CROPP, 1995).

Apesar das dificuldades em se determinar quais mecanismos estão envolvidos especificamente na progressão de tumores mamários, acredita-se que há uma seqüência de estágios histopatológicos e clínicos bem definidos (POLYAK, 2001). É sugerido que se inicia com uma hiperplasia epitelial atípica seguida por um carcinoma *in situ* que progride para um carcinoma invasivo, culminando em um câncer de mama metastático (BECKMAN et al., 1997). Embora haja uma variedade de alterações genéticas moleculares relatadas nestes estágios histopatológicos, o significado patogênético destes eventos e como eles se relacionam com os vários estágios da progressão da doença ainda não são compreendidos (POLYAK, 2001) (Figura 1).

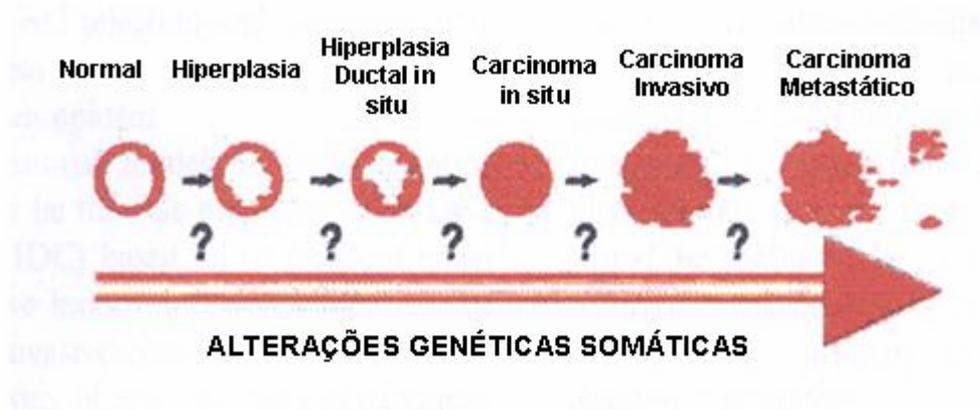


Figura 1. Estágios histopatológicos da tumorigênese mamária.  
Fonte: POLYAK, 2001.

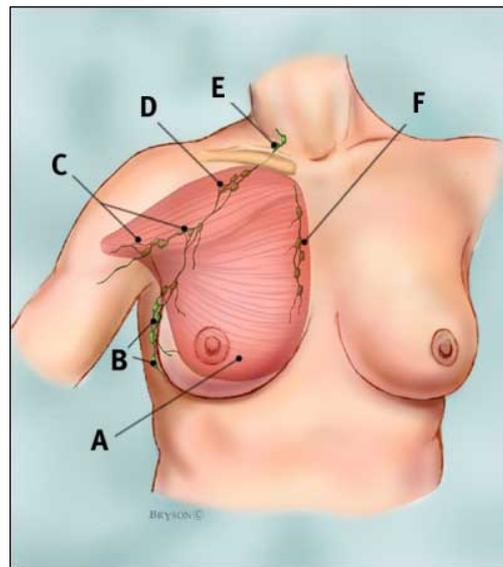
## 2.2. Linfonodos Axilares e Sentinela no Prognóstico do Câncer de Mama

Atualmente, o estadiamento tumoral mamário e prognóstico do paciente são baseados em parâmetros histológicos e clínicos, como presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares, tipo e tamanho do tumor, presença ou ausência de receptores hormonais (para estrógeno e para progesterona) e amplificação do gene *ERBB2*. De acordo com os parâmetros de classificação histoprognóstica de carcinoma mamário de Scarff, Bloom e Richardson (SBR), mais comumente utilizado, tumores classificados como grau I apresentam prognóstico favorável, de grau II apresentam prognóstico intermediário e de grau III apresentam pior prognóstico. Esses parâmetros foram inicialmente criados para as formas ductais, mas atualmente, são aplicados a todos os tipos histológicos de carcinomas invasivos, exceto nas formas medulares e de carcinoma *in situ* (Bloom e Richardson, 1957; Contesso, 1987, citados por RIETJENS e URBAN, 2007). A ausência de expressão de receptores hormonais pelas células tumorais é um fator de mau prognóstico em curto prazo, considerando que 70% a 80% das pacientes onde o tumor apresenta receptores hormonais responderão a uma hormonioterapia (Fisher et al., 2005, citado por RIETJENS e URBAN, 2007). A amplificação do gene *ERBB2* ocorre em cerca de 30% dos cânceres de mama invasivos e representa um mau prognóstico (SLAMON et al., 1987; SESHADRI et al., 1993). Sabe-se que pacientes que apresentam receptores hormonais, mas que apresentam amplificação do gene *ERBB2*, não respondem ao tratamento hormonal com tamoxifeno (GUSTERSON et al., 1992). Sendo assim, a detecção desta amplificação é indicativa para o tratamento com trastuzumab, um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente a proteína codificada pelo gene *ERBB2* (TUBBS et al., 2001).

A caracterização dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais eficaz para o estadiamento do câncer de mama (LINDAHL et al., 2000), sendo que a presença de metástase nestes linfonodos confere um alto risco de recorrência da doença (HERMSEN et al., 1998). Além de proporcionar um prognóstico eficaz, a dissecação dos linfonodos axilares também é efetuada por outras razões: (1) é um método confiável de controle de recorrência tanto em pacientes linfonodo positivos como negativos, com taxas de recorrência que variam de 0,5% a 3% (Recht et al., 1991; Axelsson et al., 1992; citados por SAKORAFAS et al., 2000; CLEMONS et al., 2001; WRIGHT et al., 2003); (2) permite a determinação da terapia a ser adotada para cada paciente (SAKORAFAS et al., 2000) e (3) melhora indiretamente a sobrevida das pacientes (ORR, 1999).

Apesar da sua eficiência e importância, o estadiamento baseado na análise de linfonodos axilares implica na dissecação completa dos linfonodos de nível I e II (Figura 2), de acordo com a recomendação do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) (1991). Este procedimento, no entanto, está associado com uma alta taxa de morbidade (REINTGEN et al., 2000; SAKORAFAS et al., 2000).

Entre as conseqüências mais comuns relacionadas à dissecação dos linfonodos axilares estão: redução da mobilidade do braço, infecção local, leve a intensa dor na região, seroma e linfedema (REINTGEN et al., 2000; SAKORAFAS et al., 2000; BLANCHARD et al., 2003; REITSAMER et al.; 2003).



- |  |
|--|
| <p><b>A</b> músculo peitoral principal<br/> <b>B</b> linfonodos axilares: nível I<br/> <b>C</b> linfonodos axilares: nível II<br/> <b>D</b> linfonodos axilares: nível III<br/> <b>E</b> linfonodos supraclaviculares<br/> <b>F</b> linfonodos mamários internos</p> |
|--|

Figura 2. Linfonodos adjacentes à área da mama

FONTE: BREASTCANCER.ORG – A NONPROFIT ORGANIZATION FOR BREAST CANCER EDUCATION, 2005.

Além da alta morbidade associada, dados na literatura mostram que cerca de 20% a 30% de pacientes linfonodo negativas desenvolverão recidiva da doença entre 5 a 10 anos após o diagnóstico (KAMBY et al., 1991; HELLMAN, 1994). A presença de metástases ocultas, micrometástases ou células tumorais latentes clinicamente indetectáveis, pode explicar esta taxa de recorrência nessas pacientes. A micrometástase é definida como um foco metastático menor que 2mm de diâmetro (HUVOS et al., 1971), e está associada com fatores prognósticos como tamanho do tumor e envolvimento de linfonodos axilares (REDDING et al., 1983), apesar de MANSI et al. (1999) terem indicado que a presença de micrometástases por si só, não é um fator prognóstico tão eficiente quanto os citados anteriormente. Além disso, foi sugerido que pacientes com micrometástases apresentam não somente um risco maior de recorrência, mas também um risco aumentado de recorrência

precoce (Mansi et al., 1987; Harbeck et al., 1990; Cote et al., 1991; Diel et al., 1996, citados por MANSI et al., 1999).

Atualmente, a presença de micrometástases na mama é detectada principalmente por técnicas imunohistoquímicas ou por técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HILDEBRANDT et al., 1997; BERNINI et al., 2000). A imunohistoquímica tem proporcionado um aumento acima de 40% na detecção de micrometástases em linfonodos histologicamente negativos de pacientes com câncer de mama (TSUCHIYA et al., 1996). Da mesma forma, a introdução de testes baseados em PCR está possibilitando uma detecção mais sensível de micrometástases. MITAS et al. (2001) indicaram que marcadores moleculares intragênicos a *MAM*, *PIP*, *CK19*, *MAMB*, *MUC1* e *CEA* avaliados por PCR por transcriptase reversa (**RT-PCR**), podem ser utilizados como um painel eficiente na detecção de metástases e micrometástases em cânceres mamários.

Outra desvantagem associada à dissecação de linfonodos axilares como procedimento padrão para estadiamento de cânceres de mama, é que mais da metade das pacientes submetidas a ele apresentam linfonodos livres de metástases, tendo sido, portanto, submetidas a complicações e riscos cirúrgicos desnecessários (GIULIANO et al., 1997).

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas mais eficientes que possibilitem a determinação do estadiamento de pacientes com câncer de mama, através de procedimentos pouco ou não invasivos, poderia evitar a necessidade de dissecação axilar, diminuindo assim a morbidade gerada por esse procedimento e aumentando a sobrevida livre de doença (VERONESI et al., 1997).

Nesse sentido, a biópsia do linfonodo sentinela (o primeiro linfonodo da axila) tem sido utilizada. (GIULIANO, 1996; VERONESI et al., 1999; 2001).

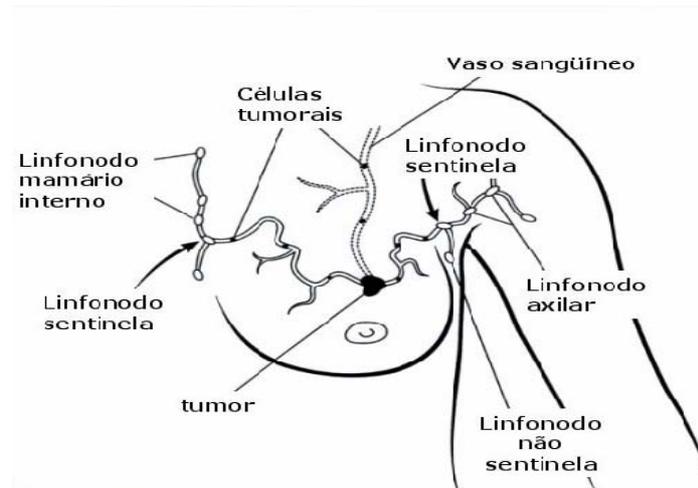


Figura 3: Localização dos linfonodos sentinela mamários.  
 FONTE: CENTRO AVANÇADO DE PREVENÇÃO DO CÂNCER, 2004

O nome sentinela foi sugerido pela primeira vez em 1960, quando GOULD et al. propuseram a excisão de rotina deste linfonodo durante a parotidectomia total para tratamento do carcinoma de parótida. No câncer de mama, com o emprego de corantes vitais injetados no parênquima mamário, ficou evidenciado que a drenagem linfática convergia para um canal linfático único, que se direcionava para a axila e poderia ter localização variável (HALSELL et al., 1965). Em 1976, CABANAS apresentou o conceito moderno de linfonodo sentinela quando, em seu trabalho sobre câncer de pênis, observou que ao se injetar o corante vital no dorso do pênis, uma cadeia limitada de linfonodos era identificada, representando dessa forma, a evidência de um centro primário específico de drenagem linfática, o linfonodo sentinela. Esse conceito foi fortalecido por diferentes observações experimentais e a primeira grande série (194 amostras) de biópsias de linfonodos sentinela foi relatada por MORTON et al. (1992) que, através da aplicação intradérmica de corante vital

em melanomas primários, mostraram a possibilidade de sua identificação e remoção. Em cânceres de mama, o primeiro artigo no qual foi descrita a identificação de linfonodos sentinela foi publicado por GIULIANO et al. (1994). Neste estudo, os linfonodos sentinela puderam ser identificados em 114 dos 174 (65,5%) procedimentos cirúrgicos realizados utilizando corante vital. Além disso, foi possível inferir a classificação quanto à presença de metástases em outros linfonodos axilares em 95,6% dos casos analisados.

Diversos estudos para o aprimoramento da identificação de linfonodos sentinela e a validação desta técnica em cânceres de mama foram realizados, e foi verificado que o sucesso do método depende da técnica de detecção utilizada, do número de cortes histológicos analisados e das características individuais das pacientes. Foi ainda observado que a taxa de resultados falso-negativos não variou significativamente dependendo da experiência do cirurgião que efetuou o procedimento (KRAG et al., 1998b). A baixa incidência de resultados falso-negativos encontradas em geral (1,0% - 11,0%) , ou seja, amostras negativas para metástase em linfonodo sentinela, mas positivas em linfonodos axilares, possibilitou que este método fosse validado, permitindo sua introdução na rotina clínica (GIULIANO et al., 1994; GIULIANO et al., 1997; BORGSTEIN et al. 1998; COX et al., 1998; KRAG et al., 1998a, b; O'HEA et al., 1998; VERONESI., 1999; VERONESI et al., 2001; NANO et al., 2002).

Entre as vantagens dessa técnica estão: (1) a evidente redução na morbidade das pacientes comparada com a análise do estadiamento axilar através da sua completa dissecação (GIULIANO et al., 1998, 2000; SCHRENCK e WAYAND, 2000; GOLSHAN et al., 2003; PEINTINGER et al., 2003); (2) o aumento na eficiência da detecção de metástases não reveladas anteriormente pelo esvaziamento axilar

(GIULIANO et al., 1995; WIDT-LEVERT et al., 2003; LEIDENIUS et al., 2004); (3) uma análise mais aprofundada e eficaz da presença de metástases em apenas um ou dois linfonodos, ao contrário da análise limitada de múltiplos linfonodos (10 a 30, normalmente) efetuada no esvaziamento axilar (WEIGELT et al., 2004) e (4) a obtenção de informações adicionais sobre metástase nos nódulos mamários internos (ESTOURGIE et al., 2004).

Além disso, diversos estudos têm permitido a aplicação da biópsia de linfonodos sentinela em situações que eram, anteriormente, contra-indicadas, como por exemplo, em casos de câncer de mama multicêntrico. A contra-indicação se devia ao fato de que focos múltiplos do câncer podem drenar para diferentes linfonodos, aumentando assim, a taxa de falso-negativos (SCHWARTZ et al., 2002). Por outro lado, uma série de artigos tem sido publicada mostrando que a sensibilidade e a taxa de identificação de metástase em linfonodos sentinela, em pacientes com cânceres de mama multicêntricos, têm sido similares a de pacientes com doença unifocal (SCHRENK et al., 2001; KIM et al., 2002; TOUSIMIS et al., 2003; GOYAL et al., 2004; GENTILINI et al., 2006), apoiando, dessa forma, a aplicação desta técnica mesmo nestes casos.

A reavaliação de linfonodos sentinela, com análises histo-patológicas mais precisas, tem mostrado que é possível detectar focos celulares tumorais não detectados previamente. Em uma série de estudos, amostras que foram primeiramente avaliadas pelo método de coloração hematoxilina & eosina (HE), foram submetidas a uma nova análise por técnicas imunohistoquímicas, e estas mostraram a presença de metástases em 4% a 29% das pacientes (WEAVER et al., 2000; STITZENBERG et al., 2002; PARGAONKAR et al., 2003; CHAGPAR et al., 2005). Porém, o significado de tais metástases é incerto, e dessa forma, atualmente,

essas pacientes não são tratadas terapêuticamente como linfonodo-positivas (CHAGPAR et al., 2005). Dados quanto a possível influência da presença de micrometástases na sobrevida das pacientes são conflitantes. Enquanto alguns estudos sugerem uma sobrevida reduzida (WEAVER et al., 2000; HANSEN et al., 2001), outros não mostram qualquer impacto associado à sua presença (CHAGPAR et al., 2005). Conseqüentemente, um número maior de estudos e o acompanhamento de pacientes por um maior período de tempo pós-cirúrgico são necessários para esclarecer essa questão.

Utilizando 73 marcadores em 30 linfonodos sentinela, ABDUL-RASOOL et al. (2006) desenvolveram um teste utilizando **RT-PCR**, para uma análise de alta especificidade e eficiência para detecção de micrometástases em linfonodos sentinela de pacientes com câncer de mama. A análise molecular, usando uma combinação dos marcadores hMAM-A e MAGE-A3, permitiu a identificação de 90% de metástases, enquanto que 77% de detecção foi obtida por técnicas imunohistoquímicas e apenas 37% de detecção foi obtida com o uso do método de coloração hematoxilina & eosina, sendo, portanto, a nova técnica considerada eficaz para detecção de micrometástases em linfonodos sentinela. Outros estudos têm mostrado resultados semelhantes, comprovando dessa forma, a eficiência da RT-PCR na detecção de metástases em linfonodos sentinela (HUGHES et al., 2006; MIKHITARIAN et al., 2006; NISSAN et al., 2006).

Outro aspecto importante com relação à técnica do linfonodo sentinela é o conhecimento sobre as conseqüências a longo prazo quanto a recidiva axilar após a remoção deste linfonodo, sendo inclusive muito importante examinar a taxa de recidiva clínica em pacientes que apresentaram linfonodo sentinela negativo (KOKKE et al., 2005). Vários estudos indicam que as taxas de recidiva observadas

nestas pacientes variam de 0% a 1,4%, demonstrando que a biópsia de linfonodos sentinela é um procedimento que apresenta baixa taxa de recorrência clínica, a qual pode substituir de maneira segura, de acordo com critérios pré-estabelecidos, a dissecação de linfonodos axilares quando a biópsia do linfonodo sentinela for negativa (GIULIANO et al; 2000; SHRENK et al., 2000; VERONESI et al., 2001; 2003; ROUMEN et al., 2001; CHUNG et al., 2002; REITSAMER et al., 2003; NAIK et al., 2004; KOKKE et al., 2005; SMIDT et al., 2005; TAKEI et al., 2007).

Apesar da extensa pesquisa clínica, poucos estudos, avaliando as características genéticas dos linfonodos sentinela, têm sido realizados.

### **2.3. Alterações Genéticas em Amostras Pareadas de Tumores Primários e Metastáticos**

O desenvolvimento do câncer de mama é conseqüência do acúmulo de alterações genéticas em que processos como a ativação de proto-oncogenes e inibição de genes supressores de tumor podem resultar na perda do controle da proliferação de células epiteliais, invasão de tecidos e inibição da apoptose. Entre os mecanismos envolvidos na ativação e inibição destes genes estão mutações de ponto, amplificações e deleções. A identificação das regiões envolvidas nesses eventos resulta no reconhecimento de genes relacionados com o início e progressão do câncer de mama, o que é de grande importância para a compreensão do comportamento biológico e molecular do processo carcinogênico (WEINBERG, 1985; 1991; COOPER, 1994).

A análise de amostras pareadas do mesmo paciente tem possibilitado a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de metastatização, com importância fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um provável comportamento clínico mais agressivo do tumor (KUUKASJARVI et al., 1997a).

Uma série de estudos utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular tem comparado as alterações cromossômicas encontradas nos tumores primários de mama com as existentes nas metástases correspondentes, numa tentativa de definir a presença de alterações específicas a cada uma destas lesões (PANDIS et al., 1994; 1998; TEIXEIRA et al., 1996a; 2002; BERNARDINO et al., 1997; KUUKASJARVI et al., 1997 a,b; NISHIZAKI et al., 1997; CAVALLI et al., 2003). Apesar destes estudos ainda serem limitados, observa-se, em geral, que as lesões metastáticas apresentam alterações cromossômicas mais complexas do que as dos tumores primários. Além disso, determinadas aberrações cromossômicas são observadas com maior frequência nas metástases, sugerindo que possam existir eventos especificamente associados ao processo de disseminação tumoral (PANDIS et al., 1994; 1998; TEIXEIRA et al., 1996b).

KUUKASJARVI et al. (1997a), utilizando técnicas de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), analisaram amostras de 29 tumores primários de mama e suas correspondentes metástases, localizadas em diversos sítios anatômicos (pulmão, medula óssea, cavidade abdominal entre outros). As alterações observadas em comum nos dois grupos estudados foram: ganhos em 1q, 3q26-qter, 6p22, 7p21-qter, 8q, 17q22-q24, e perdas em Xp, 8p, 9p, 11q14-qter, 13cen-q14, 16q, 17p e 22q. Ganho na região

Xq12-q22 foi somente observado nos grupos metastáticos. NISHIZAKI et al. (1997), utilizando CGH, compararam 11 pares de tumores primários de mama e suas metástases linfonodais. Em geral, foi observado um maior número de alterações cromossômicas nos linfonodos quando comparados com os tumores primários, sendo que nestes observou-se alta frequência de regiões amplificadas. Os autores ainda descreveram que as alterações mais comuns observadas em ambos os grupos foram ganhos em 1q, 8q e 17q, e perdas em Xp, 6q, 8p, 9q, 13q, 16q e 17p.

Alguns estudos têm investigado a associação entre alterações cromossômicas e dados clínico-patológicos e prognósticos em câncer de mama. (ISOLA et al., 1995; HERMSEN et al., 1998; AUBELE et al., 2002; JANSENN et al., 2003). Uma associação prognóstica foi observada por ISOLA et al. (1995) para a amplificação de 20q, a qual foi identificada em sete casos, seis dos quais apresentaram recorrência da doença em menos de 32 meses após a cirurgia. Entretanto, AUBELE et al. (2002) não observaram associação entre os ganhos em 20q com a sobrevida livre de metástase e prognóstico. Amplificações em 20q têm sido descritas como características de tumores de mama em estágio avançado, sugerindo que a região 20q apresenta um papel importante na tumorigênese e no desenvolvimento tumoral, favorecendo, principalmente, o desenvolvimento de metástases (TANNER et al., 1994; 1996; HODGSON et al., 2003). Vários genes mapeados nesta região foram observados amplificados em câncer de mama, incluindo os genes *AIB* (*Amplified in Breast Cancer*), *AIB1*, *AIB2* e *AIB3* (ANZICK et al, 1997), *ZNF217* (NONET et al, 2001), *NABC1* (COLLINS et al, 1998) entre outros.

ISOLA et al. (1995) verificaram uma significativa associação entre recorrência e alto nível de amplificação em 8q, onde o proto-oncogene *MYC* está localizado, ao contrário de AUBELE et al. (2002) que não verificaram esta associação.

JANSSEN et al. (2003) detectaram, por CGH, alterações cromossômicas em 76 amostras de cânceres de mama invasivos linfonodo negativos e correlacionaram os resultados com outros fatores prognósticos. Assim como em outros estudos, o índice de atividade mitótica foi identificado como o melhor fator prognóstico morfológico independente (JANNINK et al., 1995; MANDERS et al., 2002). JANSSEN et al. (2003) observaram a associação entre deleção em 1p e cânceres linfonodo positivos, sugerindo a presença de um gene supressor nessa região que atuaria no controle da proliferação de células tumorais, resultando na alta taxa do índice mitótico. Além disso, foi observado que ganho em 3q é um indicador prognóstico independente e o mais significativo para a recorrência da doença.

Na maioria dos estudos acima referidos, os sítios metastáticos analisados, assim como a avaliação de fatores prognósticos, foi em relação aos linfonodos axilares e/ou sítios mais distantes. Neste sentido, é de interesse o estudo de alterações genéticas em metástases proximais, como no linfonodo sentinela.

O estudo genético do linfonodo sentinela é de grande importância para o reconhecimento e compreensão dos mecanismos iniciais que estão relacionados ao processo de metastatização. Até o presente, no entanto, segundo o nosso conhecimento, existe somente um estudo na literatura onde este tipo de análise foi realizado em metástases nos linfonodos sentinela de pacientes com câncer de mama (CAVALLI et al., 2003). Utilizando a técnica de CGH, os autores apresentaram dados preliminares do presente estudo, analisando as alterações cromossômicas em seis casos de tumores primários de mama e em metástases nos linfonodos sentinela correspondentes. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos amostrais quando o número total de alterações cromossômicas foi comparado, o mesmo acontecendo quanto à complexidade cariotípica. Algumas

alterações, no entanto, foram observadas com maior freqüência nos linfonodos sentinela, como por exemplo: perdas em 6q13~q23 e 13q13~q32 e ganhos em 9q31-qter, 11p15~21, 12q23~qter, 16p e 20q12~qter.

#### **2.4. Alterações Epigenéticas no Câncer de Mama**

Além dos eventos genéticos, alterações epigenéticas também estão envolvidas na tumorigênese mamária. As que ocorrem em regiões promotoras de genes supressores de tumor e outros genes relacionados ao câncer têm uma significativa hipermetilação de ilhas CpG em comparação com células normais (BAYLIN et al., 2001; ESTELLER et al., 2001). Como estes genes regulam a proliferação celular e sua metilação contribui para o silenciamento transcricional, é aceitável admitir que sua metilação pode estar envolvida na progressão do câncer mamário. A identificação do perfil de metilação em tumores primários de mama associados a metástases, não apenas elucidaria os eventos epigenéticos envolvidos na progressão do câncer mamário, mas também poderia ajudar no desenvolvimento de um painel de marcadores genéticos para auxiliar no prognóstico dos pacientes (SHINOZAKI et al., 2005).

CAVALLI et al. (2003) analisaram o perfil de metilação dos genes *TP16*, *THBS2*, *ECAD*, *RARB2*, *MINT1*, *MINT2* e *MINT3* em seis tumores primários de mama e seus correspondentes linfonodos sentinela. Apenas em dois dos seis casos, o perfil de metilação mostrou resultados idênticos nos tumores primários e nos linfonodos sentinela. Os outros casos mostraram perfis diferentes sem nenhuma tendência consistente, indicando alta heterogeneidade entre as amostras. Os

autores sugerem que esta variabilidade, presumivelmente, origina-se de uma metilação heterogênea nos tumores primários, seguida de uma seleção clonal nos linfonodos sentinela. Um número maior de genes e de amostras deve ser analisado para compreender a significância biológica destes achados. Porém, não há dúvida que esta heterogeneidade deve ser considerada quando o perfil de metilação for analisado como marcador tumoral ou prognóstico.

SHINOZAKI et al. (2005) estudaram o padrão de metilação dos genes *RASSF1A*, *APC*, *TWIST*, *CDH1*, *GSTP1* e *RAR-B2* em amostras metatásticas de linfonodos sentinela. O objetivo deste estudo era determinar se a hipermetilação da região promotora destes genes estava associada à presença de metástases em linfonodos sentinela e se poderia ser utilizada como um indicador molecular da progressão tumoral. Os autores observaram que a metilação na região promotora do gene *GSTP1* estava relacionada à um aumento do tamanho do tumor e à maior probabilidade de aparecimento de metástase em linfonodos sentinela. Foi observado, ainda, que a expressão do gene *RARB2* está associada positivamente com tumores *ERBB2* positivos e com a presença de metástases em linfonodos sentinela, conferindo um prognóstico desfavorável para as pacientes (ROSS e FLETCHER, 1999).. Além disso, a análise de amostras de tumores primários e dos linfonodos sentinela correspondentes mostrou uma concordância de 90% no perfil de metilação, sugerindo uma predominância de clonalidade epigenética entre as células metastáticas dos linfonodos sentinela.

## 2.5. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A técnica de CGH, extensivamente utilizada para a identificação das alterações genéticas associadas ao câncer, permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma. Utiliza-se de uma amostra de DNA genômico teste (amostra tumoral de cada paciente) e uma de DNA genômico de referência (usado como controle, podendo ser uma amostra de tecido normal, como sangue ou pele, do paciente, ou ainda, pode ser uma amostra de um indivíduo qualquer que seja cariotipicamente normal). As amostras são marcadas por diferentes moléculas repórteres, normalmente biotina e digoxigenina, respectivamente, na presença de *Cot -1 DNA*, que contém seqüências repetitivas do genoma e que é hibridizada previamente para bloquear tais seqüências. Posteriormente, ambos os DNAs são hibridizados simultaneamente em cromossomos metafásicos normais (controle) que servem como a base da hibridização. Estes cromossomos geralmente não são do paciente, mas são, preferencialmente, de um indivíduo cariotipicamente normal.

A hibridização é detectada por meio de dois fluorocromos que se ligam às moléculas repórteres, como o FITC (verde), que se liga à biotina, e TRITC (vermelho), que se liga à digoxigenina. As sondas combinadas competem por sítios de hibridização complementares, conseqüentemente, se uma região apresenta ganho e/ou amplificação do número de cópias de DNA na amostra tumoral em comparação com o DNA de referência (normal), estes são visualizados por um excesso de sinal verde, e se uma região apresenta perda e/ou deleção, estas são visualizadas por um excesso de sinal vermelho. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se

um *software* específico, que converte os dados da intensidade de hibridização para um perfil linear. Ganhos e ampliações no DNA teste são identificados como regiões cromossômicas com razões de fluorescência aumentadas, enquanto perdas e deleções resultam numa razão de fluorescência reduzida. Amplificações são diferenciadas de ganhos por apresentarem razões de fluorescência maiores em decorrência do maior número de cópias de DNA encontrados em uma região específica, em comparação com o DNA de referência (normal). Da mesma forma, deleções são diferenciadas de perdas por apresentarem razões de fluorescência menores em decorrência da ausência de seqüências de DNA genômico encontrada em uma região específica em comparação com o DNA de referência (normal). Quando não há ganhos e/ou ampliações, assim como, perdas e/ou deleções não há excesso de sinal verde ou vermelho, respectivamente, e o que se observa nestas regiões é um sinal azul (KALLIONIEMI et al., 1992) (Figura 4).

A sensibilidade da técnica é restrita à pureza da população celular usada no estudo, e à extensão e tamanho das alterações. CGH não detecta alterações de baixa freqüência, ou seja, as alterações devem estar presentes em uma porcentagem grande de células, pois esta técnica detecta apenas o clone predominante (KALLIONIEMI et al., 1994; WEISS et al., 1999).

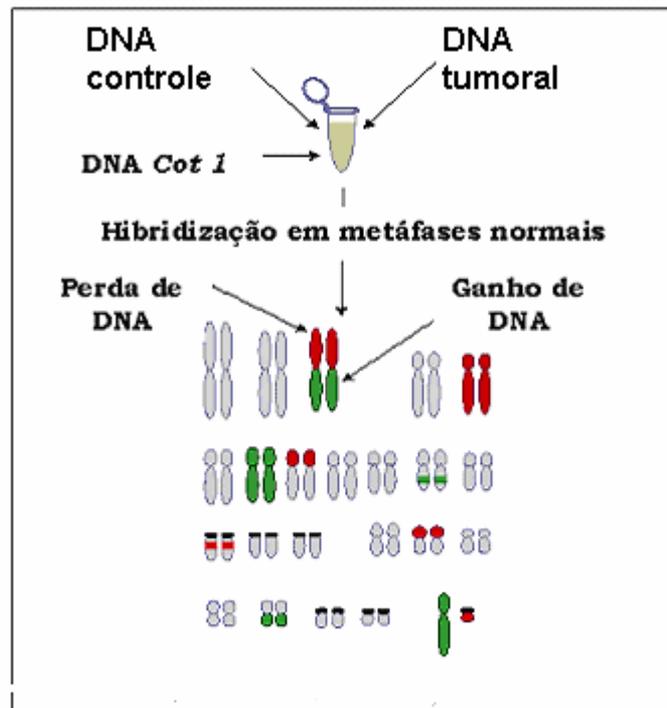
Como nenhuma cultura celular é necessária, essa metodologia possibilitou um grande progresso na análise de alterações cromossômicas em tumores de tecidos sólidos. Aplicações da mesma na pesquisa do câncer incluem sua utilização na triagem de tumores através de alterações genéticas específicas, localização de genes envolvidos na carcinogênese de subgrupos particulares de cânceres, análise de tumores em modelos experimentais para obter indícios da progressão tumoral,

classificação diagnóstica, assim como avaliação prognóstica (ISOLA et al., 1995; RIED et al., 1996; HERMSEN et al., 1998; SIMON et al., 1998; TIENARI et al., 1998).

Nos estudos de câncer de mama, a técnica de CGH tem contribuído para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores de câncer mamário e carcinoma invasivo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes supressores de tumor e oncogenes. Esta técnica vem sendo aplicada em uma grande variedade de lesões mamárias, desde as benignas até cânceres de mama invasivos e metastáticos (REIS-FILHO et al., 2005).

A aplicação desta técnica em estudos comparativos entre tumores primários e metástases em linfonodos sentinela correspondentes proporcionará uma análise de melhor resolução para a caracterização das anormalidades cromossômicas presentes nestes tecidos. Além disso, a caracterização das alterações cromossômicas nas metástases em linfonodo sentinela poderá auxiliar no melhor entendimento da história natural e do comportamento biológico e clínico dos tumores malignos, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de novos métodos de determinação de fatores preditivos e prognósticos no câncer de mama. No futuro, espera-se poder prever com segurança quais as pacientes com envolvimento do linfonodo sentinela, que apresentam risco aumentado de comprometimento de outros nódulos axilares, podendo-se limitar o uso de métodos terapêuticos invasivos, como o esvaziamento axilar, em portadores de tumores de mama.

a)



b)

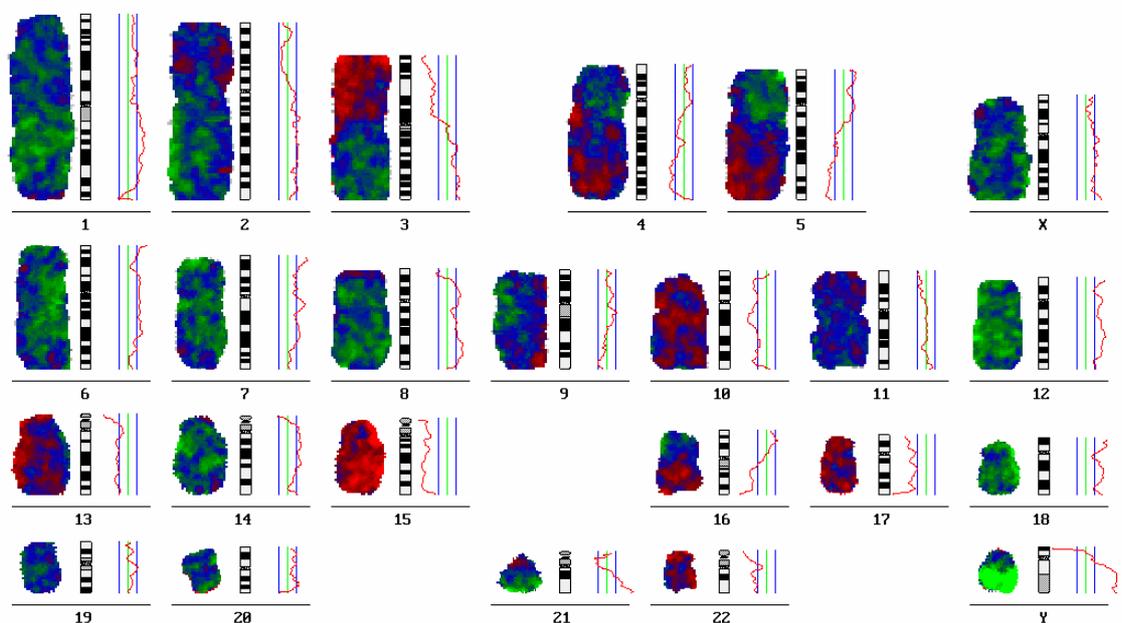


Figura 4. (a) Ilustração esquemática da técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH). (b) Resultado obtido após análise digital de imagem com visualização de perdas e ganhos de regiões cromossômicas.

FONTE: MCNEIL e RIED, 2000 (a); BAAK et al., 2003 (b).

## 2.6. OBJETIVOS

- Identificar a presença de alterações do número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano em tumores primários e nas metástases em seus linfonodos sentinela correspondentes, utilizando o método de CGH;
- Comparar as anormalidades observadas nestes diferentes tecidos, quanto à presença e padrão de alterações no número de cópias de DNA;
- Comparar os resultados observados com os existentes na literatura de amostras pareadas da mesma paciente em tumores primários e metástases em linfonodos axilares não-sentinela, analisando, inclusive, a progressão tumoral mamária;
- Correlacionar as alterações detectadas com a localização de genes envolvidos na tumorigênese mamária.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras de carcinomas mamários foram coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. Foram obtidas 20 amostras pareadas provenientes de blocos de tecido parafinado fixado em formalina e armazenados nos Laboratórios de anatomia patológica dos referidos hospitais. Os experimentos de CGH foram realizados na Universidade de Georgetown, Washington, DC., sob supervisão da Dr<sup>a</sup>. Luciane Regina Cavalli e do Dr. Bassem Haddad. Todas as amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento pelas pacientes, cujos dados clínicos e histo-patológicos foram constantemente atualizados e podem ser facilmente acessados pelo clínico responsável (anexo). Este projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), Brasília, registro número 7220, de 20 de fevereiro de 2003 (anexo).

#### **3.1. Caracterização da Amostra**

Foram estudados, após remoção cirúrgica, amostras de carcinomas mamários e seus linfonodos sentinela correspondentes de 20 pacientes do sexo feminino, caucasóides, não aparentados e com idade média igual a  $56,65 \pm 11,95$  anos. Das 20 pacientes, uma era portadora de carcinoma mamário classificado histologicamente como carcinoma ductal invasivo grau I, 15 de carcinomas ductais invasivos grau II e uma de carcinoma ductal invasivo grau III. Além destas, uma era portadora de carcinoma lobular invasivo grau II. Em duas pacientes, não foi determinado o grau histológico tumoral. A média do tamanho dos carcinomas

estudados foi igual a 3,51 cm  $\pm$  2,28 cm (Tabela 1). Dos 20 casos, seis (casos 1, 2, 4, 15, 16, 18) foram previamente analisados e publicados (CAVALLI et al., 2003).

Tabela 1. Dados clínico-histopatológicos das pacientes.

<b>Caso</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>TT (cm)</b>	<b>Patologia</b>	<b>GH</b>
<b>1</b>	53	2,5	CDI	II
<b>2</b>	45	4,0	CDI	I
<b>3</b>	66	1,0	CDI	II
<b>4</b>	54	5,5	CDI	II
<b>5</b>	75	8,0	CDI	II
<b>6</b>	58	1,0	CDI	II
<b>7</b>	37	2,0	CDI	II
<b>8</b>	59	2,0	CDI	II
<b>9</b>	34	2,8	CDI	II
<b>10</b>	59	2,0	CDI	II
<b>11</b>	50	3,5	CDI	II
<b>12</b>	56	3,5	CDI	Si
<b>13</b>	67	5,0	CLI	Si
<b>14</b>	44	1,2	CDI	II
<b>15</b>	51	6,0	CDI	II
<b>16</b>	64	5,5	CDI	II
<b>17</b>	47	5,0	CLI	II
<b>18</b>	75	8,0	CDI	II
<b>19</b>	64	0,8	CDI	II
<b>20</b>	75	1,0	CDI	III

**TT:**Tamanho do tumor; **CDI:** carcinoma ductal invasivo; **CLI** : carcinoma lobular invasivo; **GH:** grau histológico; **si:** sem informação.

### **3.2. Procedimentos Técnicos**

#### **3.2.1. Microdissecção Celular e Extração de DNA**

Para cada amostra de tecido parafinizado, um corte de espessura de 4 $\mu$ m foi corado pelo método de hematoxilina & eosina (H&E) e histologicamente examinado

para confirmar a presença de tecido tumoral. Esta lâmina foi utilizada como molde para a microdissecção do material tumoral em lâminas adicionais, sem corantes, contendo cortes consecutivos do tecido seccionado imediatamente ao corte anterior e, portanto, igual ao da lâmina molde. A microdissecção celular nestas lâminas foi realizada com o auxílio de uma agulha, para separação das células normais e do estroma, a fim de evitar a contaminação por células não tumorais.

O tecido parafinado foi tratado com xilol para remoção da parafina e, em seguida, tratado com etanol 100% para remoção do xilol permitindo a posterior rehidratação da lâmina, caso necessário. A extração de DNA foi realizada com o uso do *DNeasy tissue kit* – Qiagen, seguindo as orientações específicas do fabricante para tecidos conservados em parafina.

Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas e analisadas em gel de agarose (2%) para determinar a qualidade do mesmo.

### **3.2.2. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)**

A técnica de CGH foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por FIGUEIREDO et al. (1999), de acordo com as seguintes etapas:

**Marcação por fluorescência do DNA teste e DNA controle:** *Nick Translation* (FEINBERG, 1983) foi realizada para marcar o DNA teste com biotina (Roche, Indianapolis, IN) e o DNA controle com digoxigenina (Roche), permitindo a incorporação de moléculas repórteres de DNA na posição dUTP16.

**Preparação das Sondas:** DNA teste e DNA controle foram tratados na presença de excesso de *Cot-1* (50µg) (Invitrogen, Carsbad, CA) para bloquear as seqüências repetitivas, sendo posteriormente desnaturados a 90° C e hibridizados a 37° C.

**Preparo das lâminas:** As lâminas de cromossomos metafásicos de um voluntário saudável foram submetidas a um pré-tratamento em solução de 2XSSC (NaCl / citrato de sódio). Posteriormente, as lâminas foram submetidas à solução de desnaturação (70% formamida / 30% 2xSSC pH 7,0) a 80°C e desidratadas em uma série de etanóis em diferentes concentrações (70, 90 e 100%).

**Hibridização:** Foram aplicados 15µl da solução contendo as sondas sobre a preparação desnaturada contida na lâmina. A lâmina foi selada e incubada em estufa por pelo menos 72 horas a 37° C.

**Lavagem pós-hibridização:** Após a hibridização as lâminas foram lavadas em solução de 50% de formamida para remoção de moléculas repórteres e fluorocromos não hibridizados. A seguir, as lâminas foram expostas a uma solução bloqueadora, para bloquear ligações não-específicas durante a detecção (próximo passo).

**Detecção:** Utilizou-se o procedimento de detecção indireta, contendo as seguintes soluções de anticorpos, marcados por fluorocromos: Avidina – FITC, *mouse anti-Digoxigenina*, *rabbit anti-mouse* – TRITC, *biotinylated anti-Avidin* e *Goat anti-Rabbit* TRITC. A contracoloração foi realizada utilizando-se uma solução de DAPI e uma

solução para evitar a redução ou perda da intensidade dos sinais fluorescentes (*antifade*).

### **3.3. Obtenção das Imagens**

As imagens do DNA tumoral marcado com FITC, do DNA controle marcado com TRITC e do contracolorante DAPI de pelo menos 20 metáfases de cada hibridização foram captadas com uma câmera CCD (*cooled charge-couple device*) (CH250; Photometrics, Tucson, AZ) conectada a um microscópio Leica DMRBE equipado com filtros ópticos específicos para os fluorocromos usados TR1, TR2, TR3 (Chroma Technology, Brattleboro, VT).

### **3.4. Análise das Imagens**

A avaliação quantitativa da hibridização foi realizada usando um *software* disponível comercialmente (Applied Imaging, Pittsburg, PA). A razão média dos perfis de CGH é computada como o valor médio de 5 a 10 imagens obtidas para identificar as alterações no número de cópias em todos os casos. Ganhos foram considerados quando a razão obtida foi maior que 1,25 e amplificação quando a razão foi maior que 1,5. Perdas foram consideradas quando a razão foi menor que 0,75 e deleções quando a razão foi menor que 0,5 (figura 5a e b). A interpretação dos perfis foi feita independentemente por dois observadores. Neste estudo, alguns casos apresentaram perfis irregulares para certos cromossomos, como para os cromossomos 21 e 22. Isto é esperado quando o DNA utilizado na hibridização é de baixa qualidade, como é o caso de amostras fixadas em formalina e conservadas em

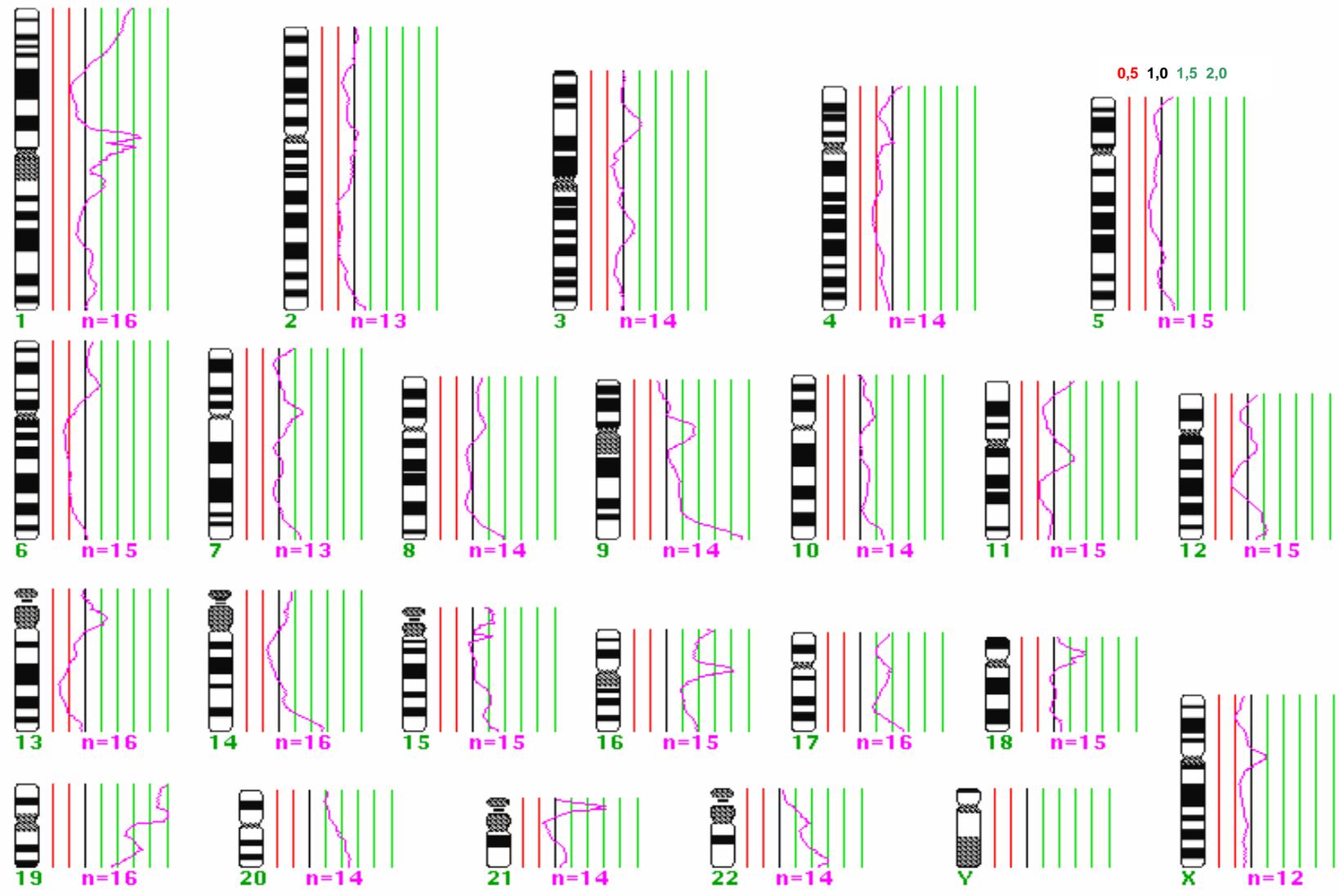


Figura 5(a). Perfil de CGH do caso 1, tumor primário.  
**1 a 22, Y, X : cromossomos; n : número de cromossomos analisados**

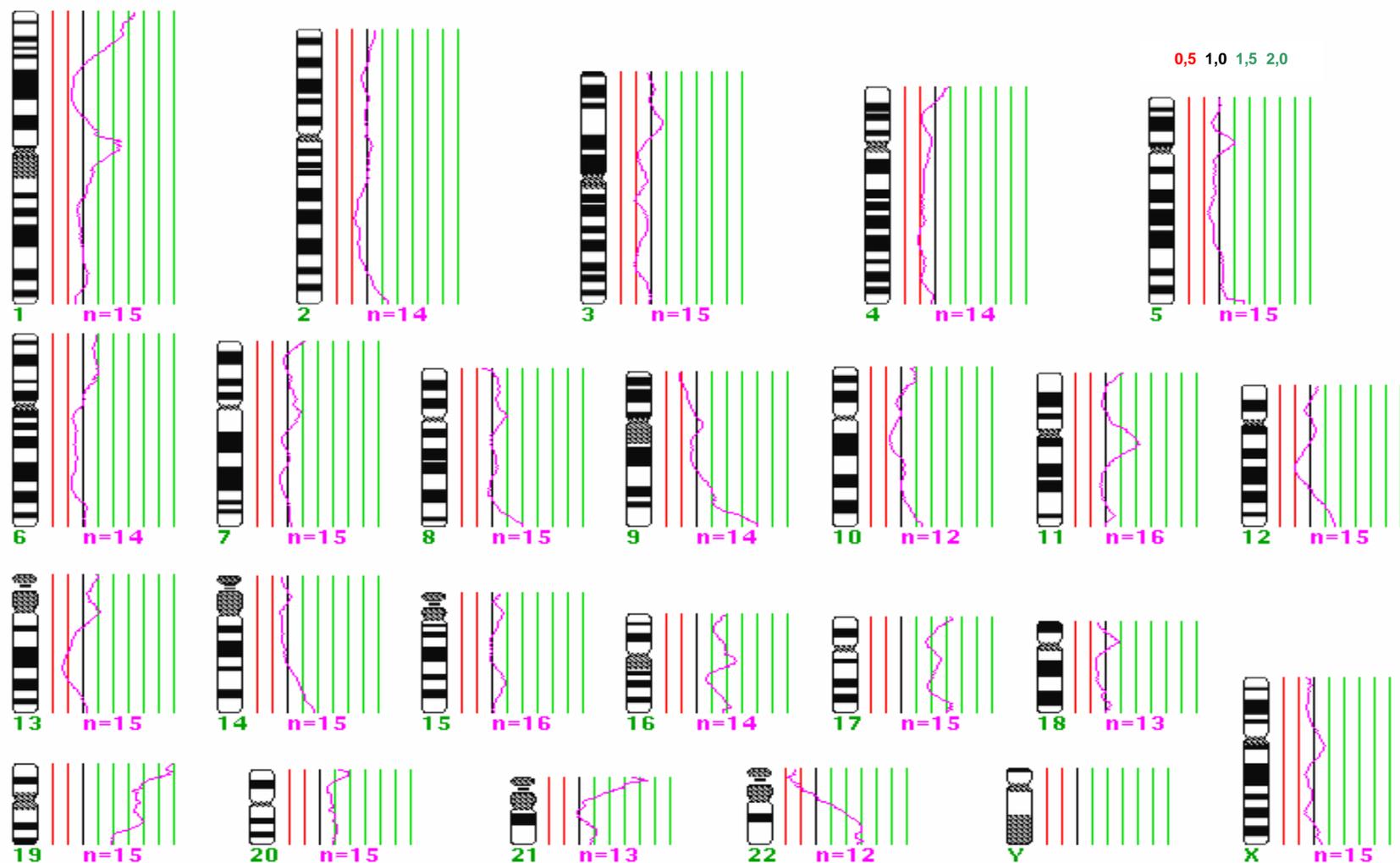


Figura 5(b). Perfil de CGH do caso 1, linfonodo sentinela.

1 a 22, Y, X : cromossomos; n : número de cromossomos analisados

parafina. Portanto, nestes casos, para não obter resultados falso-positivos, as anormalidades possivelmente presentes (normalmente ganhos) nestes cromossomos não foram consideradas. É importante considerar, que o método de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) não é confiável na interpretação de regiões centroméricas, teloméricas e heterocromáticas, especialmente, como a dos cromossomos 21 e 22 devido à intensa presença de seqüências repetitivas nessas regiões do genoma (KALLIONIEMI et al., 1994).

### **3.5. Análise Estatística**

O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar a casualidade de ocorrência do total de alterações cromossômicas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela tanto nos 20 casos como nos 21 cromossomos analisados e para avaliar a homogeneidade da distribuição do total de alterações cromossômicas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela tanto nos casos como nos cromossomos analisados.

A análise da variância foi utilizada para comparação das diferenças entre as médias do número de alterações cromossômicas (ganhos e perdas) nos tumores primários e nos linfonodos sentinela tanto nos casos como nos cromossomos estudados.

O teste *t* de Student foi utilizado para comparação entre as diferenças das médias do número de ganhos, de perdas e do total de alterações cromossômicas observadas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela, tanto para casos como para os cromossomos.

O coeficiente de correlação foi utilizado para avaliar o grau de dependência do número de alterações cromossômicas (ganhos, perdas e total de alterações, separadamente) observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes, tanto entre os 20 casos, como nos 21 cromossomos analisados.

Todos os testes foram utilizados de acordo com as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988).

#### 4. RESULTADOS

Foram analisados pela técnica de CGH convencional, 20 pares de tumores primários de mama e metástases em seus linfonodos sentinela correspondentes. Alterações do número de cópias do DNA foram observadas em todos os casos analisados (Tabelas 2 e 3).

A Tabela 4 apresenta as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em **tumores primários** por caso. Nos 20 casos de tumores primários de mama estudados neste trabalho, foi encontrado um total de 220 alterações cromossômicas, com uma média de  $11,00 \pm 6,22$  alterações por caso. Foi observado que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ( $\chi^2_{19} = 66,67$ ;  $P < 0,001$ ), sendo que os casos 3 (23 - 10,5%), 13 (23 - 10,5%) e 6 (20 - 9,1%) foram os que apresentaram um maior número de alterações cromossômicas, com oito ganhos e 15 perdas, 14 ganhos e nove perdas e 17 ganhos e três perdas, respectivamente. Os casos 15 e 20 (4 - 1,8%) com quatro ganhos em ambos apresentaram o menor número de alterações. Os ganhos de cópias de DNA (144) foram mais freqüentes do que as perdas (76) com um número médio de  $7,20 \pm 3,33$  e  $3,8 \pm 3,90$ , respectivamente.

A Tabela 5 apresenta as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em tumores primários por cromossomo. Observou-se um número médio de  $10,48 \pm 5,66$  alterações por cromossomo e sua distribuição não ocorreu ao acaso nos cromossomos estudados ( $\chi^2_{20} = 61,08$ ;  $P < 0,001$ ). Os cromossomos com maior número de alterações foram os de número 1 (24 - 11,0%) com 18 ganhos e seis perdas, o 20 (20 - 9,1%) com 20 ganhos e o 16 (18 - 8,2%) com 17 ganhos e

Tabela 2. Alterações cromossômicas observadas nos tumores primários.

<b>TUMOR PRIMÁRIO</b>											
<b>Amostra</b>	<b>C 1</b>	<b>C 2</b>	<b>C 3</b>	<b>C 4</b>	<b>C 5</b>	<b>C 6</b>	<b>C 7</b>	<b>C 8</b>	<b>C 9</b>	<b>C 10</b>	<b>C 11</b>
1	+1p32~pter	-2q22~q36		-4q		-6q13~q23			++9q21~qter		
2	+1p21~q24							+8q23~qter	-9p		
3	+1p33~pter -1p31~p21 +1q33~qter	-2q22~q34	-3	-4q	-5	-6q13~q23	-7p21~p14 -7q22~q32	-8			-11q14~q22
4	+1q22~qter -1p21~pter		+3	-4		-6q13~q23			++9q31~qter		++11p15~q21
5	+1p32~pter	-2q22~q36				-6q13~q23					
6	+1q		+3q12~q24		+5q23~qter	+6p21.2~pter -6q13~q23		+8q		+10q21~pter, +10q24~qter	+11p15~q21
7	-1p31~p21,					-6q13~q23		++8q24.1~qter			+11p14~p12
8	+1p32~pter		+3p21~ter								+11p12~q14
9	+1p33~pter, +1q			-4q	-5p15.2~q23	-6q	+7q22~qter		-9p ++9q33~qter		
10											
11	+1p32~pter -1p34.2~p21	-2q22~q36		-4		+6p12~p22 -6q13~q23			+9q33~ter		-11q14~qter
12	+1p32~pter	+2p14~2p23		+4	+5						
13	++1p33~pter	-2q22~q34			-5q12~q22	-6q13~q23 +6p21.3~pter		+8p, -8q11.2~q21.3	+9q31~qter		-11q14~q22 +11p15~pter
14		-2q13~q31									-10p13~pter
15	+1p21~q24		+3								
16	+1q22~qter	+2q24~qter						+8q23~qter -8p21~pter	+9q31~qter		++11p15~q21
17	+1p32~pter +1q22~qter					+6p21.1~pter					
18	-1p21~p34.2	-2			+5			++8q23~qter			++11p15~p21
19	+1p33~pter -1p31~p21			-4q		-6q13~q23			-9p21~pter +9p13~q21		+ 11p14~p12, - 11q14~q22
20							+7q22~qter				

C1 – C11 : Cromossomo 1 – cromossomo 11; + : ganho; ++ : amplificação; - : perda

Continua

Continuação

Amostra	C 12	C 13	C 14	C 15	C 16	C 17	C 18	C 19	C 20	C X
1		-13q13~q32			+16	+17		+19	++20q12~qter	
2		-13q13~q32			+16	+17			+20	
3	-12q14~q22 +12q24.1~qter	-13q		+15q22~q23	+16	+17	-18q12~21	+19	+20	-Xp21~pter -Xq21~qter
4	+12q23~qter	-13q13~q32			+16				+20	
5					+16	+17		++19	++20	
6	+12p11.2~p22	-13q	+14q24~q31	+15	+16	+17	++18p -18q21~qter	+19	+20	+Xq13~q22
7					+16			+19	+20q13	
8							+18p		+20	
9	-12q14~q22	-13q13~32			+16p	+17q	+18p	+19	+20 ++20q	-X
10	+12q23~qter				+16p	+17p		+19	+20	
11	-12q14~q21 +12q22~qter				+16	+17	+18p	++19	++20	-Xq21~q26
12						+17			+20q13	
13	++12q23~qter, -12q14~q22	-13q13~32	+14q24~qter		+16 ++16q22~qter	+17 ++17q	-18q21~qter	+19	++20q	-Xq21~q26 ++Xq26
14					+16p		+18p	+19p	+20p	
15	+12q23~qter				+16					
16	+12q23~qter	-13q13~q32		-15q23~qter	-16q13~qter				++20q12~qter	
17					+16p	+17p		+19	+20	-Xp21~pter -Xq21~q26
18	+12q23qter	-13q13~q32	-14q		+16p	+17p			++20q	
19	-12q14~q22 +12q23~qter	-13q13~q32		+15q22~q25	+16q22~qter	+17		++19	+20	-Xp22.2~p11.3 -Xq21~q26
20				+15q22~qter				+19	+20p	

C12 – CX : Cromossomo 12 – Cromossomo X; + : ganho; ++ : amplificação; - : perda

Tabela 3. Alterações cromossômicas observadas nos linfonodos sentinela.

<b>LINFONODO SENTINELA</b>											
<b>amostra</b>	<b>C 1</b>	<b>C 2</b>	<b>C 3</b>	<b>C 4</b>	<b>C 5</b>	<b>C 6</b>	<b>C 7</b>	<b>C 8</b>	<b>C 9</b>	<b>C 10</b>	<b>C 11</b>
1	+1p32~pter	-2q22~q36		-4q		+6p21.2~pter -6q13~23			++9q21~qter		
2						+6p21.2~pter					+11p15~q21
3	+1p33~pter -1p31~p22 +1q33~pter	-2q22~q34			-5q				+9q31~qter		
4	+1q22~qter -1p21~pter	-2				+6p21.2~pter -6q13~q23		+8q23~qter	++9q31~qter		+11p15~q21
5	+1p32~pter			-4q		-6q13~q23					
6	-1p					-6p -6q13~q23				+10p	
7	+1p32~pter	-2p12~p21 -2q14.1~q31						+8p12~22			
8	+1p32~pter					+6p21.3~p21.1				+10p	
9		-2q32~q36			-5q14~q23	-6q13~q23					
10				+4q33~qter							
11	+1p31-p32										
12	+1q22~qter					-6q13~q23					-11q14~q22
13	-1p31~p22 +1q	-2q22~q34	-3p13~q13.3	-4	+5	-6q	-7p15~q31	+8p21~p11.2 +8q23~qter	+9q31~qter	+10p13~pter	-11q14~q22 +11p15~pter
14	-1p22~p32 +1q21~q31	-2q22~q36		-4q13~q26							
15	+1p21~q24 +1p32~pter			-4	-	+6p21.2~pter 5p15.3~q23 -6q13~q23			+9q31~qter		+11p15~q21
16	+1p32~pter +1q22~qter	+2q24~qter						++8q23~qter			+11q
17	+1p32~pter			-4	-5	-6q13~23					-11p13~p14
18		-2q22~q36				-6q13~23					+11p15~q21
19										-10q21~q22	
20	+1p32~pter -1p34.2~p21	-2q22~q36		-4	-5q12~q32	+6p -6q13~q23					

C1 – C11 : Cromossomo 1 – cromossomo 11; + : ganho; ++ : amplificação; - : perda

Continua

Continuação

amostra	C 12	C 13	C 14	C 15	C 16	C 17	C 18	C 19	C 20	C X
1		-13q13~q32			+16	+17		+19	+20	
2		-13q13~q32			+16p					
3	+12q23~qter			+15q22~q23	+16	+17		++19	+20 ++20q12~13.1	-Xq21~qter
4					+16		-18q		+20	
5	-12q14~q21 +12q22~qter	-13q13~q32			+16p	+17		++19	+20	-Xq21~q26
6			-14q22~qter		-16q		-18q21~qter	+19		+Xq13~q22
7		++13q22~q31		-15 q14~q22		+17p				
8		-13q13~q32					+18p -18q	+19 ++19p		-Xq -Xp21~pter
9							-18q12~q21	+19		-Xp11.4~p22.1 -Xq21~q26
10				+15q24~qter						
11								+19p		
12								+19	+20	
13	+12q23~qter	-13q13~32	+14q24~qter	+15q22~q25	+16	+17	-18q21~qter	++19	+20 ++20q	-Xq21~q26
14					+16		+18p	+19	+20p	-Xq21~q26 -Xp11.4~p22.1
15	+12q23~qter	-13q13~q32			+16	+17			+20q12~qter	
16	+12q23~qter	-13q13~q32		-15q23~qter	-16q13~qter					
17		-13q13~q32				+17		++19	+20	
18		-13q13~q32			+16		+18p		+20	-X
19						+17p	+18p	+19		
20	-12q14~q21 +12q22~qter	-13q13~q32			+16	+17		++19	+20	-Xp21~pter -Xq21~q26

C12 – CX : Cromossomo 12 – Cromossomo X; + : ganho; ++ : amplificação; - : perda

Tabela 4. Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas em tumores primários por caso.

C \ F	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	6	4	5	2	8	15	7	4	5	2	17	3	5	2	5	0	10	7	5	0
%	4,2	5,3	3,5	2,6	5,6	20	4,9	5,3	3,5	2,6	11,8	3,9	3,5	2,6	3,5	0	6,9	9,2	3,5	0
TG	10		7		23		11		7		20		7		5		17		5	
%	4,5		3,2		10,5		5,0		3,2		9,1		3,2		2,3		7,7		2,3	

Continua

Continuação

C \ F	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		TOTAL	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	8	7	7	0	14	9	4	2	4	0	7	4	7	2	7	4	9	9	4	0	144	76
%	5,6	9,2	4,9	0	9,7	11,8	2,8	2,6	2,8	0	4,9	5,3	4,9	2,6	4,9	5,3	6,3	11,8	2,8	0	65,0	35,0
TG	15		7		23		6		4		11		9		11		18		4		220	
%	6,8		3,2		10,5		2,7		1,8		5,0		4,1		5,0		8,2		1,8			

C: Caso; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; G: Ganhos; P: Perdas.

Tabela 5. Frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em tumores primários por cromossomo.

CR F	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	18	6	2	7	4	1	1	6	3	3	4	10	2	2	6	3	7	3	2	1	8	4
<b>%</b>	12,5	7,9	1,4	9,2	2,8	1,3	0,7	7,9	2,1	3,9	2,8	13,2	1,4	2,6	4,2	3,9	4,9	3,9	1,4	1,3	5,6	5,3
<b>TG</b>	24		9		5		7		6		14		4		9		10		3		12	
<b>%</b>	11,0		4,1		2,3		3,2		2,7		6,4		1,8		4,1		4,5		1,4		5,5	

Continua

Continuação

CR F	12		13		14		15		16		17		18		19		20		X		TOTAL	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	10	5	0	10	2	1	4	1	17	1	14	0	5	3	13	0	20	0	2	9	144	76
<b>%</b>	6,9	6,6	0,0	13,2	1,4	1,3	2,8	1,3	11,8	1,3	9,7	0,0	3,5	3,9	9,0	0,0	13,9	0,0	1,4	11,8	65	35
<b>TG</b>	15		10		3		5		18		14		8		13		20		11		220	
<b>%</b>	6,8		4,5		1,4		2,3		8,2		6,4		3,6		5,9		9,1		5,0			

CR: cromossomo; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; G: Ganhos; P: Perdas.

uma perda. Estes cromossomos foram também os que apresentaram maior número de ganhos de regiões cromossômicas (18 – 12,5%, 20 – 13,9% e 17 – 11,8%, respectivamente). No cromossomo 13 nenhum ganho foi observado. O maior número de perdas ocorreu nos cromossomos 6, 13 (10 - 13,2%) e X (9 - 11,8%), sendo que nos cromossomos 17, 19 e 20 as mesmas não foram observadas. O número médio de ganhos de cópias de DNA foi igual a  $6,86 \pm 6,09$  e o de perdas foi igual a  $3,62 \pm 3,26$ .

A Tabela 6 apresenta as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em **linfonodos sentinela** por caso. Foram observadas 188 alterações cromossômicas com um número médio de  $9,40 \pm 5,22$  alterações por caso. Assim como nos tumores primários, nos linfonodos sentinela as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso nos 20 linfonodos analisados ( $\chi^2_{19} = 54,98$ ;  $P < 0,001$ ). Os casos 13 (25 – 13,3%) com 15 ganhos e 10 perdas, 20 (16 – 8,5%) com sete ganhos e nove perdas e 3 (14 – 7,4%) com 10 ganhos e quatro perdas apresentaram o maior número de alterações, enquanto que o caso 11 (2 – 1,1%) com dois ganhos apresentou o menor número de alterações. Os ganhos de cópias de DNA (108) foram mais freqüentes do que as perdas (80) com um número médio de  $5,40 \pm 3,52$  e de  $4,00 \pm 2,60$ , respectivamente.

A Tabela 7 apresenta as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em linfonodos sentinela por cromossomo, observando-se um número médio de  $8,95 \pm 5,54$  alterações por cromossomo. Da mesma forma que nos tumores primários, foi observado que a distribuição de alterações cromossômicas não ocorreu ao acaso entre os cromossomos ( $\chi^2_{20} = 68,47$ ;  $P < 0,001$ ). Os cromossomos com maior número de alterações foram os 1 (23 – 12,2%) com 17

Tabela 6. Freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em linfonodos sentinela por caso.

C F	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	7	4	3	1	10	4	7	4	6	5	3	6	4	3	6	4	1	6	3	0
<b>%</b>	6,5	5,0	2,8	1,3	9,3	5,0	6,5	5,0	5,6	6,3	2,8	7,5	3,7	3,8	5,6	5,0	0,9	7,5	2,8	0,0
<b>TG</b>	11		4		14		11		11		9		7		10		7		3	
<b>%</b>	5,9		2,1		7,4		5,9		5,9		4,8		3,7		5,3		3,7		1,6	

Continua

Continuação

C F	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		TOTAL	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	2	0	3	2	15	10	5	5	9	4	6	3	4	5	4	4	3	1	7	9	108	80
<b>%</b>	1,9	0,0	2,8	2,5	13,9	12,5	4,6	6,3	8,3	5,0	5,6	3,8	3,7	6,3	3,7	5,0	2,8	1,3	6,5	11,3	57	43
<b>TG</b>	2		5		25		10		13		9		9		8		4		16		188	
<b>%</b>	1,1		2,7		13,3		5,3		6,9		4,8		4,8		4,3		2,1		8,5			

**C: Caso; F: Freqüência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; G: Ganhos; P: Perdas.**

Tabela 7. Frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em linfonodo sentinela por cromossomo.

CR F	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	17	6	1	10	0	1	1	7	1	5	6	12	0	1	5	0	5	0	3	1	7	3
<b>%</b>	15,7	7,5	0,9	12,5	0,0	1,3	0,9	8,8	0,9	6,3	5,6	15,0	0,0	1,3	4,6	0,0	4,6	0,0	2,8	1,3	6,5	3,8
<b>TG</b>	23		11		1		8		6		18		1		5		5		4		10	
<b>%</b>	12,2		5,9		0,5		4,3		3,2		9,6		0,5		2,7		2,7		2,1		5,3	

Continua

CR F	12		13		14		15		16		17		18		19		20		X		TOTAL	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
<b>TP</b>	6	2	1	10	1	1	3	2	10	2	9	0	4	5	14	0	13	0	1	12	108	80
<b>%</b>	5,6	2,5	0,9	12,5	0,9	1,3	2,8	2,5	9,3	2,5	8,3	0,0	3,7	6,3	13,0	0,0	12,0	0,0	0,9	15,0	57	43
<b>TG</b>	8		11		2		5		12		9		9		14		13		13		188	
<b>%</b>	4,3		5,9		1,1		2,7		6,4		4,8		4,8		7,4		6,9		6,9			

CR: cromossomo; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; G: Ganhos; P: Perdas.

ganhos e seis perdas, 6 (18 – 9,6%) com seis ganhos e 12 perdas e 19 (14 – 7,4%) com 14 ganhos, sendo que dois deles, o 1 e o 19, foram os que apresentaram maior número de ganhos (17 – 15,7% e 14 – 13,0%, respectivamente), enquanto que as mesmas não foram observadas nos cromossomos 3 e 7. O maior número de perdas ocorreu nos cromossomos X, 6 (12 – 15,0%), 2 e 13 (10 – 12,5%). Nos cromossomos 8, 9, 17, 19 e 20 as mesmas não foram observadas. O número médio de ganhos de cópias de DNA foi igual a  $5,14 \pm 4,95$  e o de perdas foi igual a  $3,81 \pm 4,14$ .

A Tabela 8 resume as informações sobre as médias de ganhos e perdas de alterações cromossômicas por caso e por cromossomo, nos tumores primários e nos linfonodos sentinela analisados neste trabalho. Como há várias médias amostrais, a comparação estatística apropriada para avaliar simultaneamente a significância das diferenças entre as médias é a análise da variância (Fisher, 1924, cf. BEIGUELMAN, 1988).

Este teste foi aplicado tanto para casos como para cromossomos separadamente. O teste de Bartlett indicou homogeneidade das variâncias em ambas as análises:  $\chi^2_{(3)corr.} = 3,02; P > 0,30$  para casos e  $\chi^2_{(3)corr.} = 6,37; P > 0,05$  para cromossomos. Na análise de variância, os valores de F foram significativos (a 0,05) para as variáveis entre alterações cromossômicas, classificadas como ganhos e perdas, tanto para casos ( $F=10,56; G.L.=1$  e  $76; P < 0,05$ ) como para cromossomos ( $F=5,31; G.L.=1$  e  $80; P < 0,05$ ). No entanto, ao aplicarmos tanto o teste de Tukey como o de Duncan (que pode ser utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias), obtivemos os valores de 5,37 e 4,29, respectivamente para casos e 7,64 e 6,14, respectivamente para cromossomos. Estes resultados não eram esperados, contrariando os da análise da variância, já que qualquer um deles

Tabela 8. Médias de ganhos (n=144 e 76) e perdas (n=108 e 80) cromossômicas por caso e por cromossomo nos tumores primários (A) e nos linfonodos sentinela (B), respectivamente.

<b>A</b>		<b>TUMORES PRIMÁRIOS</b>				
	<b>CASO</b>			<b>CROMOSSOMO</b>		
<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>GANHO</b>	<b>PERDA</b>	<b>TOTAL</b>	<b>GANHO</b>	<b>PERDA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>média ± DP</b>	7,20 ± 3,33	3,80 ± 3,90	11,00 ± 6,22	6,86 ± 6,09	3,62 ± 3,26	10,48 ± 5,66

<b>B</b>		<b>LINFONODOS SENTINELA</b>				
	<b>CASO</b>			<b>CROMOSSOMO</b>		
<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>GANHO</b>	<b>PERDA</b>	<b>TOTAL</b>	<b>GANHO</b>	<b>PERDA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>média ± DP</b>	5,40 ± 3,25	4,00 ± 2,60	9,40 ± 5,22	5,14 ± 4,95	3,81 ± 4,14	8,95 ± 5,54

é superior à diferença entre as médias de maior e de menor valor tanto para casos ( $7,2 - 3,8 = 3,4$ ) como para cromossomos ( $6,86 - 3,62 = 3,24$ ). Segundo GOMES (1976) “pode ocorrer que o teste F seja significativo, sem que nenhuma das diferenças entre as médias seja significativa pelo teste de Tukey. Fatos semelhantes ocorrem com o teste de Duncan”.

Considerando o que acima foi descrito, a significância das diferenças entre as médias de alterações cromossômicas, classificadas como ganhos e perdas, para casos e para cromossomos foi avaliada pelo teste  $t$  de Student, conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988). De acordo com o rigor estatístico para a utilização do teste  $t$ , foi possível realizar o mesmo somente para três comparações. As comparações realizadas foram entre ganhos, entre perdas e entre o total de alterações cromossômicas dos tumores primários e das metástases de linfonodos sentinela. Assim, para casos a comparação entre as médias de ganhos nos tumores primários (7,2) e nos linfonodos sentinela (5,4) foi igual a  $t = 1,73$ ;  $P > 0,05$  e para perdas nos tumores primários (3,80) e nos linfonodos sentinela (4,0) foi igual a:  $t = 0,19$ ;  $P > 0,80$ . A análise da significância da diferença entre as médias do total das alterações cromossômicas (ganhos + perdas) nos vinte casos nos tumores primários (11,00) e nos linfonodos sentinela (9,40) indicou um valor igual a:  $t = 0,88$ ;  $P > 0,30$ . As mesmas comparações, para o número médio de alterações cromossômicas nos 21 cromossomos analisados foram realizadas. A comparação entre as médias de ganhos nos tumores primários (6,86) e nas metástases de linfonodos sentinela (5,14) foi igual a  $t = 1,01$ ;  $P > 0,30$  e para perdas nos tumores primários (3,62) e nas metástases de linfonodos sentinela (3,81) foi igual a  $t = 0,17$ ;  $P > 0,80$  e para o total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) nos 21

cromossomos nos tumores primários (10,48) e nas metástases de linfonodos sentinela (8,95) indicou um valor igual a  $t = 0,88$ ;  $P > 0,30$ .

Os gráficos de 1 a 6 ilustram a distribuição do número de ganhos, de perdas e do total de alterações cromossômicas nos tumores primários e nos linfonodos sentinela nos 20 casos (gráficos 1 a 3) e nos 21 cromossomos (gráficos 4 a 6).

É importante ressaltar, que os ganhos de número de cópias de DNA em regiões específicas sugerem a presença de proto-oncogenes nas mesmas, assim como, perdas em regiões específicas sugerem a presença de genes supressores de tumor e, portanto, as análises estatísticas realizadas, comparando estas alterações cromossômicas entre si, separadamente, são de relevância biológica.

Foi de interesse avaliar também a homogeneidade da distribuição do total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) nos tumores primários e nos linfonodos sentinela nos 20 casos analisados (Tabelas 4 a 7). O valor obtido de  $\chi^2_{19} = 45,09$ ;  $P < 0,001$ , indica que as alterações cromossômicas não se distribuíram homogeneamente quando se comparam tumores primários e metástases em linfonodos sentinela entre os casos analisados. A diferença estatisticamente significativa deveu-se, principalmente, aos resultados observados nos casos 11, 15, 19 e 20 onde os  $\chi^2$  parciais (8,05, 6,32, 6,90 e 9,26, respectivamente) totalizaram 30,53 o que representa 68% do valor do  $\chi^2$  total. A mesma análise foi realizada para avaliar a homogeneidade da distribuição do total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) em ambos os grupos nos 21 cromossomos analisados. O valor do  $\chi^2_{20}$  foi igual a 12,34;  $P > 0,90$ , sendo estatisticamente não significativo, demonstrando que as alterações cromossômicas se distribuíram homogeneamente

Gráfico 1. Número de ganhos por caso encontrados nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes.

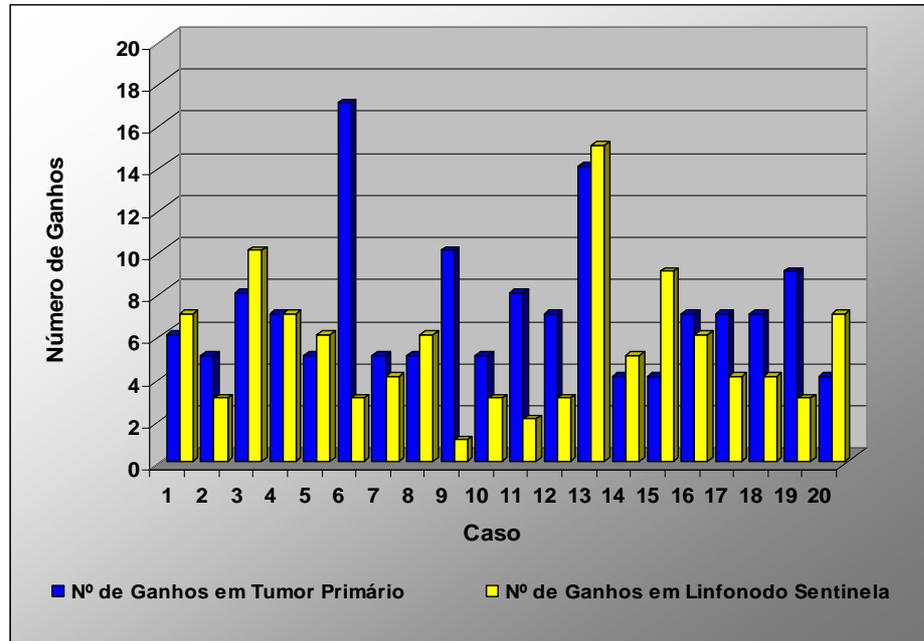


Gráfico 2. Número de perdas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes.

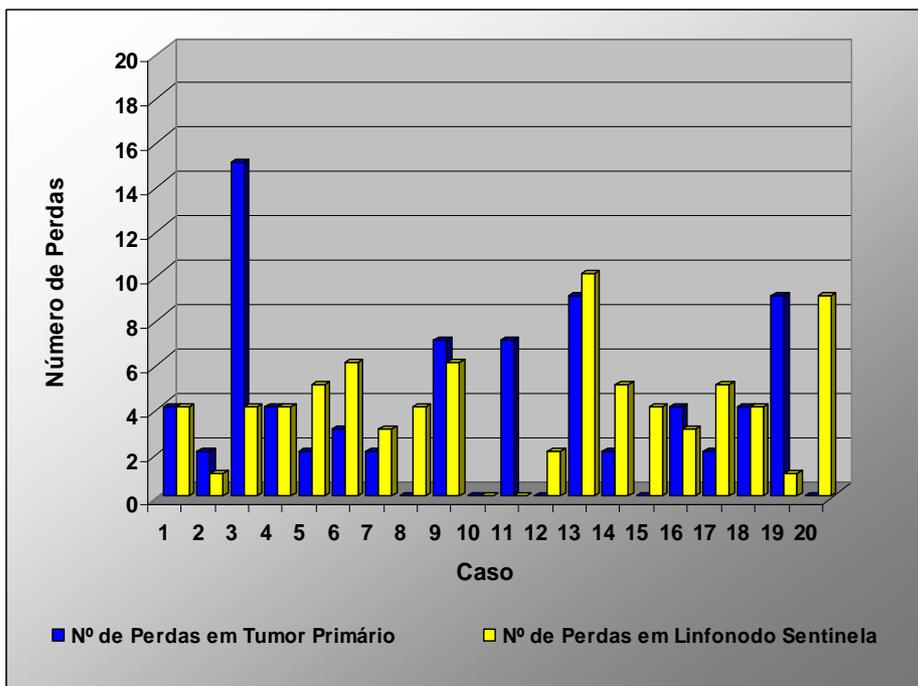


Gráfico 3. Número total de alterações cromossômicas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes por caso.

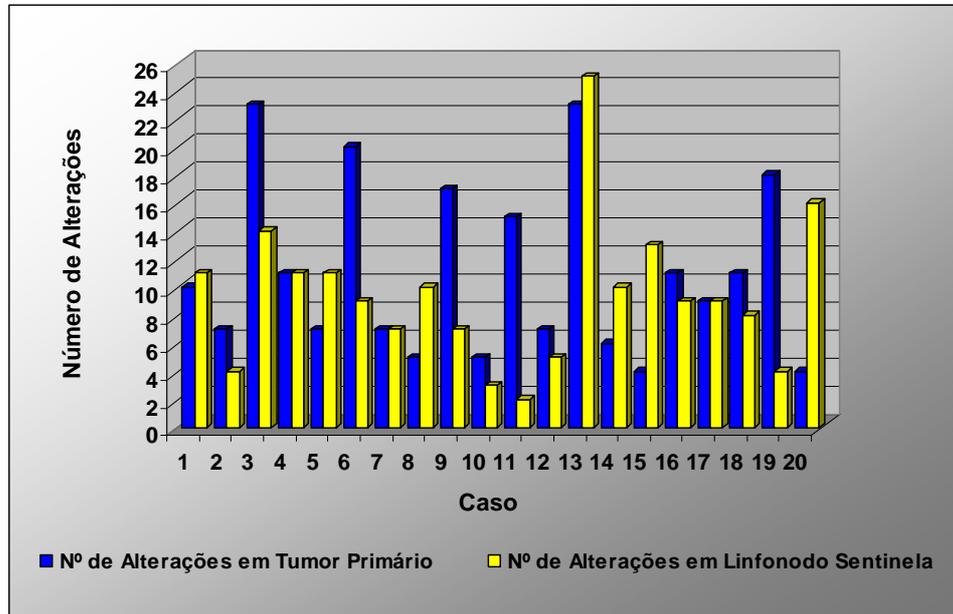


Gráfico 4. Número de ganhos por cromossomo encontrados nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes.

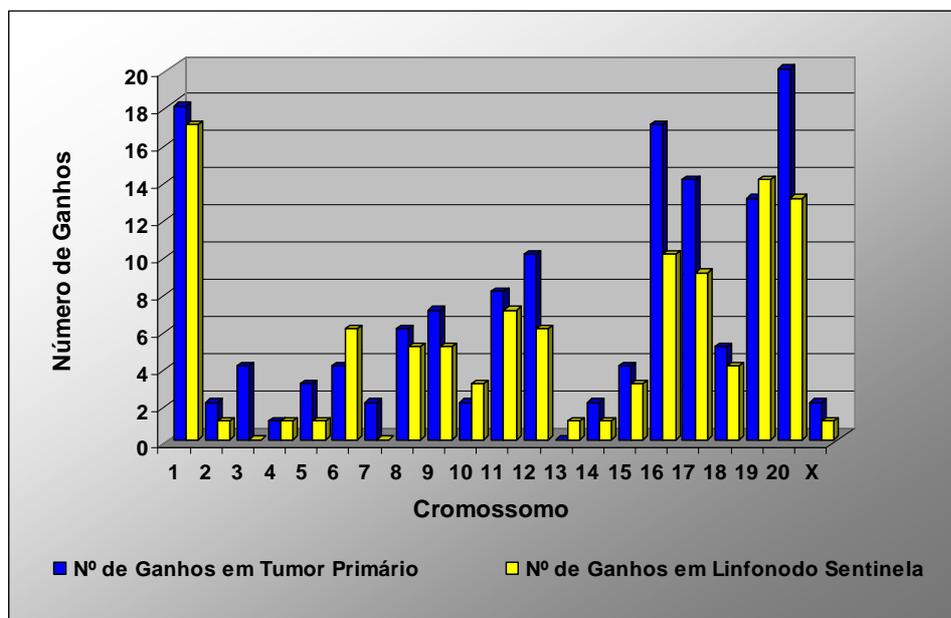


Gráfico 5. Número de perdas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes.

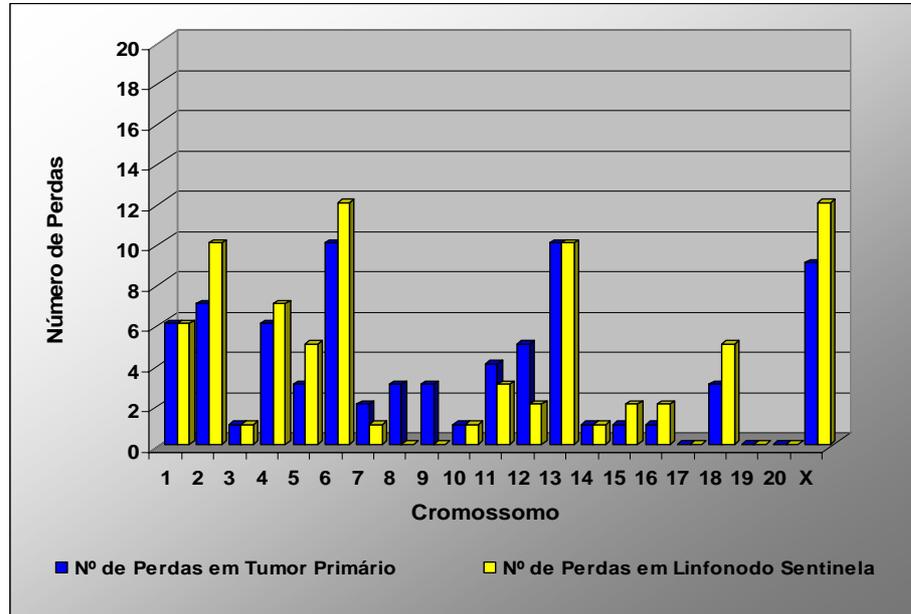
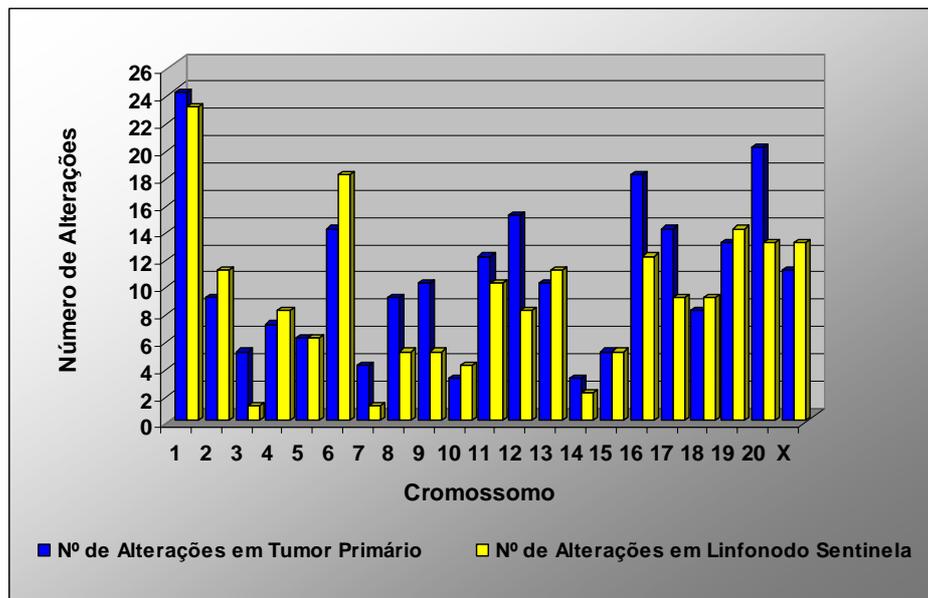


Gráfico 6. Número total de alterações cromossômicas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela correspondentes.



quando se comparam tumores primários e linfonodos sentinela entre os cromossomos analisados.

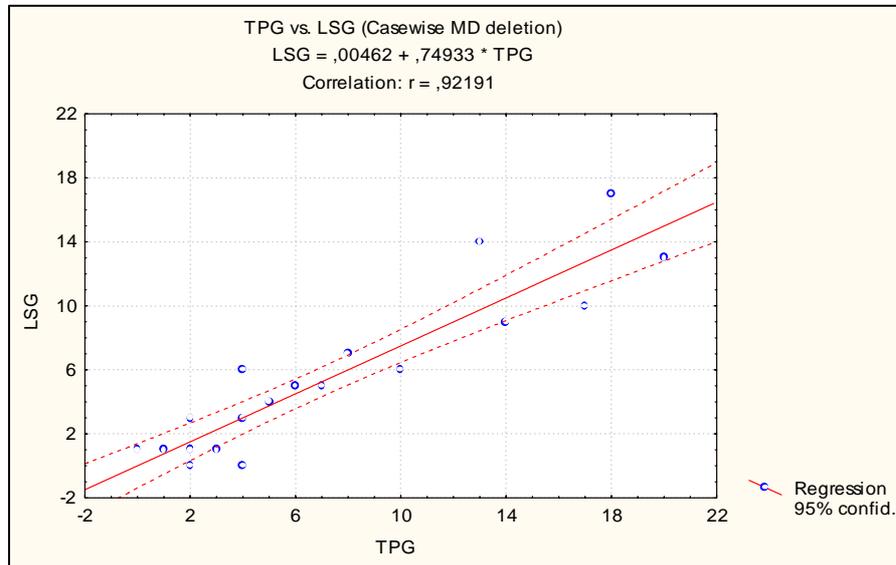
Estas informações obtidas através do teste de qui-quadrado foram melhor definidas ao aplicarmos aos dados a análise do coeficiente de correlação que indicou o grau de dependência entre o número de ganhos dos tumores primários e das metástases em linfonodos sentinela, assim como, entre o número de perdas e entre o número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas), separadamente, de ambos os tecidos nos 20 casos e nos 21 cromossomos estudados. Para casos, os valores obtidos não foram significativos para o número de ganhos ( $r = 0,09$ ;  $t = 0,42$ ;  $P > 0,50$ ), para o número de perdas ( $r = 0,067$ ;  $t = 0,28$ ;  $P > 0,70$ ) e para o número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) ( $r = 0,25$ ;  $t = 1,13$ ;  $P > 0,20$ ).

No entanto, quando as mesmas análises foram feitas considerando os 21 cromossomos, observou-se resultados significativos para ganhos ( $r = 0,92$ ;  $t = 10,37$ ;  $P < 0,001$ ), para perdas ( $r = 0,91$ ;  $t = 9,90$ ;  $P < 0,001$ ) e para o total de alterações (ganhos + perdas) ( $r = 0,83$ ;  $t = 6,53$ ;  $P < 0,001$ ). Os gráficos de 7 a 9 ilustram as últimas informações apresentadas.

Foi observado ainda, que 15 dos 20 (75%) casos apresentaram alterações cromossômicas compartilhadas, ou seja, que estão presentes tanto em tumores primários quanto em linfonodos sentinela do mesmo caso. Os casos 13, 3 e 1 foram os que apresentaram maior número de alterações compartilhadas com 12, 10 e nove alterações cromossômicas compartilhadas, respectivamente. Estas alterações cromossômicas estão apresentadas na Tabela 9.

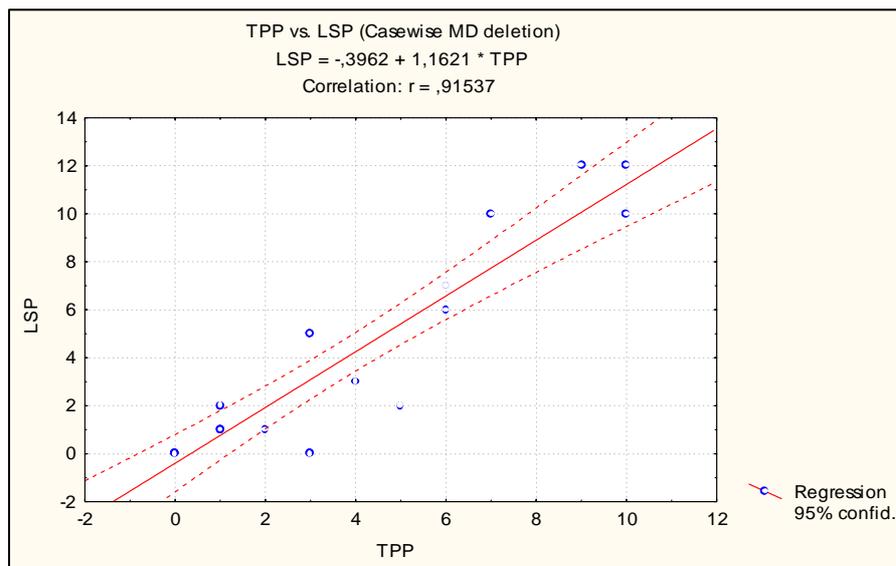
Das 408 alterações cromossômicas encontradas neste estudo, 272 (66,7%) corresponderam a alterações não compartilhadas, ou seja, que não estiveram

Gráfico 7. Distribuição do número de ganhos de acordo com os resultados do coeficiente de correlação em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



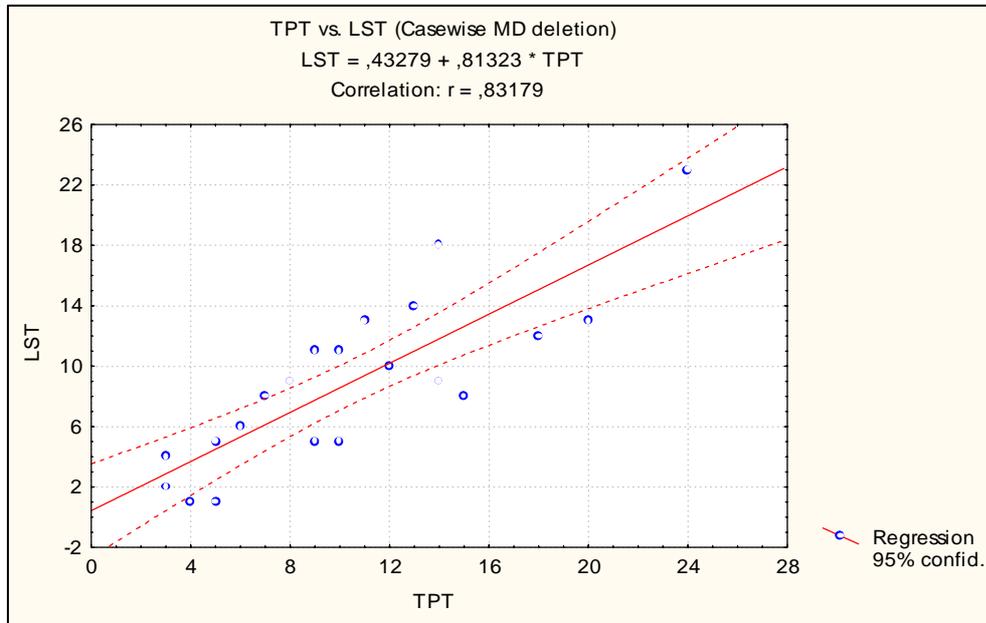
**TPG** : número de ganhos em tumores primários; **LSG** : número de ganhos em metástases nos linfonodos sentinela.

Gráfico 8. Distribuição do número de perdas de acordo com os resultados do coeficiente de correlação em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



**TPP** : número de perdas em tumores primários; **LSP** : número de perdas em metástases nos linfonodos sentinela.

Gráfico 9. Distribuição do número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) de acordo com os resultados do coeficiente de correlação em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



**TPT** : número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) em tumores primários;  
**LST** : número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) em metástases nos linfonodos sentinela.

Tabela 9. Alterações compartilhadas entre os tumores primários e linfonodos sentinela.

<b>Amostra</b>	<b>Alterações Compartilhadas</b>
<b>1</b>	+1p32~pter, -2q22~36, -4q, -6q13~q23, ++9q21~qter, -13q13~q32, +16, +17, +19 (N = 9)
<b>2</b>	-13q13~32 (N = 1)
<b>3</b>	+1p33~pter, -1p31~p21, +1q33~qter, -2q22~q34, +15q22~q23, +16, +17, +19, +20, -Xq21~qter (N = 10)
<b>4</b>	+1q22~qter, -1p21~pter, -6q13~q23, ++ 9q31~qter, +16, +20 (N = 6)
<b>5</b>	+1p32~pter, -6q13~q23, +16p, +17, ++19, +20 (N = 6)
<b>6</b>	-6q13~q23, -18q21~qter, +19, +Xq13~q22 (N = 4)
<b>8</b>	+1p32~pter, +18p (N = 2)
<b>13</b>	-2q22~q34, +9q31~qter, -11q14~q22, +11p15~pter, +12q23~qter, -13q13~32, +14q24~qter, +16, +17, +19, +20q, -Xq21~q26 (N = 12)
<b>14</b>	+18p, +20p (N = 2)
<b>15</b>	+1p21~q24, +12q23~qter, +16 (N = 3)
<b>16</b>	+1q22~qter, +2q24~qter, +12q23~qter, -13q13~32, -15q23~qter, -16q13~qter (N = 6)
<b>17</b>	+1p32~pter, +19, +20 (N = 3)
<b>18</b>	-13q13~32, +16p (N = 2)
<b>19</b>	+19 (N = 1)
<b>20</b>	+19 (N = 1)

presentes simultaneamente em amostras de tumores primários e metástases em linfonodos sentinela do mesmo paciente. O único caso que apresentou frequência maior de alterações cromossômicas compartilhadas do que de não compartilhadas foi o caso 1, que apresentou 9 alterações (42,9%) compartilhadas, do total de 21 alterações cromossômicas encontradas neste caso. O caso 5 apresentou a mesma frequência de alterações cromossômicas compartilhadas e não compartilhadas (33,3%), enquanto que os demais casos apresentaram frequência menor de alterações compartilhadas, sendo que 5 dos 20 (25%) casos (casos 7, 9, 10, 11 e 12) não apresentaram nenhuma alteração cromossômica compartilhada (Tabela 10).

Em 17 dos 20 (85%) casos foi observada a presença de alterações cromossômicas isoladas, ou seja, que ocorreram somente em um caso, seja em tumores primários ou em linfonodos sentinela. Em 11 dos 17 (64,7%) casos em que estas alterações foram observadas, foi verificado que as mesmas ocorreram tanto em tumores primários como em linfonodos sentinela. As alterações isoladas encontradas neste estudo estão listadas na Tabela 11.

Tabela 10. Número e freqüência de alterações cromossômicas compartilhadas e não compartilhadas entre tumores primários e linfonodos sentinela por caso.

caso	Número total de alterações	Alterações Compartilhadas		Alterações Não Compartilhadas	
		n	%	n	%
1	21	18	85,8%	3	14,2%
2	11	2	18,2%	9	81,8%
3	37	20	54%	17	46%
4	22	12	54,4%	10	45,6%
5	18	12	66,6%	6	33,4%
6	29	8	27,6%	21	72,4%
7	14	0	0%	14	100%
8	15	4	26,6%	11	73,4%
9	24	0	0%	24	100%
10	8	0	0%	8	100%
11	17	0	0%	17	100%
12	12	0	0%	12	100%
13	48	24	50%	24	50%
14	16	4	25%	12	75%
15	17	6	35,2%	11	64,8%
16	20	12	60%	8	40%
17	18	6	33,4%	12	66,6%
18	19	4	21%	15	79%
19	22	2	9%	20	91%
20	20	2	10%	18	90%
<b>Total</b>	408	136	33,3%	272	66,7%

**TP** = tumor primário; **LS** = linfonodo sentinela; **n** = número absoluto; **%** = freqüência

Tabela 11. Alterações cromossômicas isoladas.

CASO	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODO SENTINELA
3	-3, -7p21~p14, -7q22~q32, -8, +12q24.1~qter (N = 5)	-5q, ++20q12~13.1 (N = 2)
5	+10q21~pter, +10q24~qter (N = 2)	
6	+3q12~q24, +5q23~qter, +8q, +10q21~pter, +10q24~qter, +11p15~q21, +12p11.2~p22, +14q24~q31, +15 (N = 9)	-1p, -6p, -14q22~qter, -16q (N = 3)
7	++8q24.1~qter, +11p14~p12, -15q14~q22, +20q13.3 (N = 4)	-2p12~p21, -2q14.1~q31, +8p12~22, ++13q22~q31, -15q14~q22 (N = 5)
8	+3p21~pter, +7q32~qter, +11p12~q14 (N = 3)	+6p21.3~p21.1, +11p12~q14, -18q, -Xq (N = 4)
9	-5p15.2~q23, -9p, -X (N = 3)	-5q14~q23, -Xp11.4~p22.1 (N = 2)
10		+4q33~qter, +11p, +15q24~qter (N = 3)
11	+6p12~p22, -11q14~qter (N = 2)	+1p31~p32, +19p (N = 2)
12	+2p14~p23, +4, +20q13 (N = 3)	
13	-5q12~q22, +8p, -8q11.2~q21.3, ++Xq26 (N = 4)	-3p13~q13.3, -7p15~q31, +8p21~p11.2, +8p21~p11.2, +8q23~qter (N = 5)
14	-2q12~q31 (N = 1)	-1p22~p32, -4q13~q26, -Xp11.4~p22.1 (N = 3)
15		-5p15.3~q23 (N = 1)
16	-8p21~pter (N = 1)	+11q, -11p13~p14 (N = 2)
17	+6p21.1~pter, +17p (N = 2)	
18	-1p21~p34.2, -14q (N = 2)	
19	-9p21~pter, +9p13~q21, -Xp22.2~p11.3 (N = 3)	-10q21~q22, -Xp22.2~p11.3 (N = 2)
20	+15q22~qter (N = 1)	-5q12~q32, +6p (N = 2)

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer que apresenta maior incidência entre as mulheres brasileiras (o de pele não melanoma é o mais incidente), afetando uma em cada oito mulheres. Em cerca de 70% das pacientes com esta doença no Brasil o diagnóstico ocorre em estágio avançado, determinando, conseqüentemente, uma alta mortalidade (MS/INCA, 2006).

A caracterização dos linfonodos axilares, quanto à presença de células malignas, é o fator prognóstico mais eficaz nesta doença (LINDAHL et al., 2000), sendo que a presença de metástase nos mesmos confere um alto risco de recorrência da doença (HERMSEN et al., 1998). No entanto, o estadiamento baseado na análise de linfonodos axilares, que submete o paciente a um procedimento clínico invasivo de esvaziamento axilar, resulta em uma alta taxa de morbidade aos pacientes (REINTGEN et al., 2000; SAKORAFAS et al., 2000).

Com o objetivo de reduzir a morbidade gerada por este procedimento e aumentar a sobrevida do paciente livre de doença, a técnica de biópsia do linfonodo sentinela tem sido utilizada em várias instituições clínicas, constituindo-se num procedimento eficaz e clinicamente menos invasivo e agressivo de estadiamento. O linfonodo sentinela, em cânceres de mama invasivos, é o primeiro linfonodo da drenagem linfática tumoral que será atingido pelas células malignas mamárias, representando o primeiro sítio de metástase axilar. Se o exame histológico deste linfonodo indicar a ausência de metástases, pode-se admitir que as mesmas não estão presentes em linfonodos axilares mais distantes, e o tumor está, possivelmente, limitado ao seu sítio primário. Por outro lado, a detecção de células

malignas no linfonodo sentinela é uma indicação para o esvaziamento axilar (GIULIANO, 1996; VERONESI et al., 1999; 2001).

Desta forma, a avaliação deste linfonodo para a detecção da presença de células tumorais malignas, principalmente quando em baixas frequências, são de extrema importância. Os métodos atualmente disponíveis, que incluem a análise histopatológica e menos frequentemente a detecção de marcadores moleculares (RNAm) por análise de RT-PCR, não apresentam sensibilidade satisfatória. Há necessidade, portanto, do desenvolvimento e implementação de métodos mais sensíveis e de melhor resolução para a detecção segura de células malignas neste linfonodo, principalmente nos casos onde a análise histopatológica é negativa.

A análise citogenética do linfonodo sentinela é de grande importância para o reconhecimento e compreensão dos mecanismos iniciais que estão relacionados ao processo de metastatização.

A citogenética clássica teve um extraordinário avanço no início da década de 70 quando CASPERSSON e colaboradores desenvolveram o bandeamento cromossômico que permitiu não só a identificação de cada um dos cromossomos do genoma, mas também a precisa identificação de alterações cromossômicas. Porém, alterações genéticas sutis não são detectáveis por métodos de bandeamento e além disso, a análise cromossômica exige um trabalho intenso e tem limitações que incluem a inconsistência da resolução das bandas e a dificuldade em visualizar alguns rearranjos devido às propriedades da coloração de determinadas regiões do genoma. Para superar tais limitações e para detectar alterações que envolvem regiões pequenas abaixo do nível de resolução das bandas cromossômicas, métodos de hibridização *in situ* foram desenvolvidos nos anos 80 e 90, sendo a de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), o método utilizado mais comum

(PINKEL et al., 1986). Neste, o DNA é marcado e usado como sonda para hibridizar regiões específicas dos cromossomos humanos. Além de sondas específicas de segmentos gênicos estão disponíveis, comercialmente, sondas teloméricas, centroméricas e do tipo pintura cromossômica, que marcam o cromossomo por inteiro. A hibridização genômica comparativa (CGH), um dos procedimentos derivados da FISH é uma das mais apropriadas estratégias para a triagem de alterações no genoma como um todo. Esta técnica permite a análise, em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma. O DNA teste (tumoral) e o DNA de referência (normal) são marcados por diferentes moléculas repórteres na presença de *Cot -1 DNA*, usado para bloquear seqüências repetitivas do genoma, e são hibridizados simultaneamente em cromossomos metafásicos normais, sendo possível definir um perfil linear de ganhos e perdas do número de cópias de DNA (revisado por SHAFFER e BEJJANI, 2004).

A CGH foi utilizada para caracterizar as alterações cromossômicas presentes nas células tumorais dos linfonodos sentinela (CAVALLI et al., 2003). Este método apresenta uma melhor resolução em DNA, e é capaz de detectar alterações cromossômicas em amostras que apresentam pelo menos 30% de células tumorais. Adicionalmente, as alterações no DNA ocorrem e podem ser detectadas anteriormente às alterações histopatológicas, sendo de grande utilidade para a detecção de células malignas em tumores em fase inicial de desenvolvimento, quando os mesmos ainda não são detectados em nível clínico (BUERGER et al., 2001).

Neste estudo, a CGH foi utilizada com o objetivo de identificar e caracterizar as alterações cromossômicas que ocorrem durante a progressão tumoral mamária, mais especificamente as que envolvem a invasão e estabelecimento das células

malignas do seu sítio primário na mama (carcinoma invasivo) ao seu primeiro sítio de metastatização nos linfonodos axilares (linfonodo sentinela). Foram analisadas 20 amostras de tumores mamários primários e metástases em seus linfonodos sentinela correspondentes, com o objetivo de identificar a presença de alterações do número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano.

### **5.1. Alterações Cromossômicas Frequentes nos Tumores Primários**

Os cromossomos com maior número observado de alterações nas amostras analisadas de tumor primário foram os cromossomos 1 (24 - 11,0%) com 18 ganhos e seis perdas, o 20 (20 - 9,1%) com 20 ganhos e o 16 (18 - 8,2%) com 17 ganhos e uma perda, sendo que estes foram os cromossomos que apresentaram maior número de ganhos (18 - 12,5%, 20 - 13,9% e 17 - 11,8%, respectivamente) (tabela 5; gráficos 4 a 6).

Alterações no cromossomo 1 são freqüentemente relatadas em tumores de mama, assim como em uma variedade de outros tumores de tecidos sólidos, onde aberrações estruturais, além de perdas e ganhos em ambos os braços cromossômicos são encontrados (BOCKMUHL et al., 1998; CHEN et al., 1998; GEORGIADES et al., 1999; LU et al., 1999; TARUSCIO et al., 2000; STRUSKI et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2002; CHAUDHARY e SCHMIDT, 2006).

Ganhos em 1q foram identificados em 6 dos 20 (30%) casos analisados neste estudo, correspondendo a 25% das alterações observadas neste cromossomo. A alta freqüência de ganho nessa região foi verificada por CGH em uma série de outros estudos (NISHIKAZI et al., 1997; HERMSEN et al., 1998; TIRKKONEN et al., 1998; LARRAMENDY et al., 2000; LOVEDAY et al., 2000; FUNG et al., 2001;

CINGOZ et al., 2003; RENNSTAM et al., 2003; FARABEGOLI et al., 2004) sendo em muitos casos a alteração mais freqüente (HERMSEN et al., 1998; TIRKKONEN, et al., 1998; FUNG, et al., 2001; FARABEGOLI, et al., 2004). Porém, ao contrário dos estudos por último citados, ganhos em 1p foram as alterações mais freqüentes no presente estudo, correspondendo a 50% das alterações no cromossomo 1, sendo observados em 12 dos 20 (60%) casos estudados. Esta alteração foi previamente observada em alta freqüência apenas por LOVEDAY et al. (2000) que, estudando 44 carcinomas ductais e 8 carcinomas lobulares, identificaram, além de 1p, outras regiões, como 4q, 5q, 6q e 13q, que não haviam sido citadas previamente, com significativo aumento no número de cópias de DNA.

As perdas em 1p corresponderam a 25% das alterações encontradas no cromossomo 1, observadas em 6 dos 20 (30%) casos estudados. Esta alteração também foi descrita por outros pesquisadores, como um evento recorrente em tumores de mama (COURJAL e THEILLET, 1997; HERMSEN et al., 1998; TIRKKONEN et al., 1998).

Estudos utilizando *CGH-array* têm sido realizados, com o objetivo de refinar a identificação das regiões cromossômicas alteradas em câncer de mama e facilitar a identificação de genes em tais regiões, através do mapeamento de alta resolução de ganhos e perdas genômicas em um único experimento, permitindo uma avaliação loco por loco do número de cópias de DNA (PINKEL et al., 1998). Um arranjo de “spots” pequenos em uma lâmina de vidro, os quais contém variadas seqüências clonadas de DNA genômico, normalmente clones inseridos em cromossomos artificiais de bactéria (BACs), é usado como alvo para hibridização ao invés do uso de cromossomos metafásicos (SOLINAS-TOLDO et al., 1997).

Assim como em estudos usando CGH convencional, os estudos que utilizaram *CGH-array* também mostraram que ganhos em 1q são freqüentes em cânceres de mama (LOO et al., 2004; HAN et al., 2005; NESSLING et al., 2005; FRIDLAND et al., 2006).

A alta freqüência de alterações no cromossomo 1 determinou a intensificação de estudos para a localização de genes presentes neste cromossomo que estejam envolvidos com a carcinogênese mamária. Com esse objetivo, ORSETTI et al. (2006) combinaram a análise por *CGH array* e a de perfis de expressão gênica no estudo de 30 linhagens celulares e 30 amostras de cânceres primários de mama. Utilizando microarranjos, contendo clones de seqüências genômicas específicas para regiões de ambos os braços do cromossomo 1, estes autores observaram ganhos em 1q em mais de 60% das amostras analisadas, os quais estavam relacionados a um aumento na expressão de genes localizados nesta região. Através da análise de expressão gênica, por microarranjos de DNA contendo genes candidatos localizados em 1q, foram identificados 30 genes com expressão significativamente aumentada. Quase todos os genes identificados foram recentemente propostos como candidatos a estarem envolvidos na carcinogênese mamária, com diferentes funções biológicas, como por exemplo, os genes *PIP5K1A*, *MAPBPIP*, *RAB25A*, *PCTK3*, *RAB4* e *MPZL1* que são reguladores positivos da proliferação celular; os genes *USF1*, *JARID1B*, *TBX19* e *CROC4* que possuem produtos relacionados à regulação transcricional ou à remodelagem da estrutura da cromatina e os genes *VPS45A*, *ARF1*, *LYST*, *CCT3* que estão envolvidos no transporte celular (revisado por ORSETTI et al., 2006).

Em outro estudo recente, STANGE et al. (2006) analisaram 18 amostras de carcinomas ductais invasivos e 21 amostras de carcinomas lobulares invasivos por

*CGH – array*. Observando ganhos em 1q, através de uma análise minuciosa desta região foram identificados dois genes: *FMO2* e *PTGS2 (COX2)*. O gene *FMO2* não foi considerado relevante na biologia do câncer em estudos prévios. Por outro lado, o gene *PTGS2 (COX2)* está desregulado em tumores epiteliais e tem sido associado com cânceres de mama mais agressivos (tumores com tamanho grande, linfonodos axilares positivos e *ERBB2* positivos) (Arun et al., 2004; Saji et al., 2004, citados por STANGE et al., 2006). Ainda, admite-se que o produto protéico do gene *PTGS2 (COX2)*, a Prostaglandina E2, tenha uma função importante no estímulo da síntese de estrógeno e conseqüentemente, na carcinogênese de tumores de mama (BRODIE et al., 2001). Além disso, SINGH et al. (2005) observaram que a expressão aumentada do gene *PTGS2 (COX2)*, em células de câncer de mama, potencializa a mobilidade celular e a capacidade de invasão das mesmas, sugerindo sua participação no mecanismo de formação de metástases.

A pesquisa de genes candidatos, envolvidos na carcinogênese mamária em 1p, identificou proto-oncogenes, como o *NRAS*, localizado em 1p13.2 (MITCHELL et al., 1990). Este gene possui atividade de GTPase que auxilia na transmissão de sinais provenientes de receptores de fatores de crescimento, existentes na superfície da célula. Conseqüentemente, a sua ativação descontrolada, observada em tumores de mama e em outros tumores humanos, transmite sinais imprecisos determinando a desregulação da proliferação celular (ALBERTS et al., 2004). Entretanto, mutações no gene *NRAS* em cânceres de mama primários são raras (MIYAKIS et al., 1998), apesar da expressão aumentada do mesmo ter sido observada por alguns autores (DATI et al., 1991; WANG et al., 1998). Estas observações sugerem que a função do gene *NRAS* selvagem pode ser regulada produzindo quantidade exacerbada de

seu produto protéico, sem que a seqüência nucleotídica do gene seja alterada (MALANEY e DALY, 2001).

A segunda alteração mais freqüente, encontrada em todos os casos analisados neste estudo, foram os ganhos no cromossomo 20, em todo o cromossomo em 11 dos 20 (55%) casos, no braço longo em 5 dos 20 (25%) casos e no braço curto em 3 dos 20 (15%) casos. Uma série de estudos relata alta freqüência de ganhos no cromossomo 20 tanto por citogenética clássica como por CGH (TIRKKONEN et al., 1998; LARRAMENDY et al., 2000; FUNG et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2002; CINGOZ, et al., 2003; RENNSTAM et al., 2003; FARABEGOLY et al., 2004) e ainda por *CGH-array* (NESSLING et al., 2005; FRIDLAND et al., 2006).

TEIXEIRA et al. (2002) encontraram uma freqüência próxima de 11% de ganho de número de cópias de DNA na região 20p13~q13, e em todo o cromossomo 20 que, como ganhos nos cromossomos 7, 12 e 18, foram as alterações mais freqüentes descritas por estes autores. Dos 55 carcinomas primários de mama analisados por TIRKKONEN et al. (1998), 18% apresentaram ganho em 20q13. A análise de 40 tumores primários de mama de mulheres chinesas mostrou que o ganho de todo o cromossomo 20 e de pequenas regiões do mesmo (20q12~13.2), também são eventos comuns nesta população, apresentando uma freqüência de 35% (FUNG et al., 2001). Em outros estudos, ganhos em 20q foram observados em freqüências acima de 60% (LARRAMENDY et al., 2000; RENNSTAM et al., 2003).

Ganhos em 20q têm sido associados com um fenótipo tumoral mais agressivo (TANNER et al., 1996; TIRKKONEN et al., 1998; BUERGER et al., 2000), com alto grau histológico, linfonodos axilares positivos, tamanhos maiores do tumor, altas

taxas de proliferação celular e com pacientes com células tumorais negativas para o receptor de progesterona (PgR) (RENNSTAM et al., 2003).

Assim como observado no cromossomo 1, a alta frequência de alterações encontradas no braço longo do cromossomo 20, levou à intensificação de estudos moleculares em genes localizados nesta região. Três genes com envolvimento na carcinogênese mamária foram identificados: *AIB1*, *BTAK* e *PTP1B*. O gene *AIB1*, localizado em 20q12, é um membro da família SRC-1 de coativadores de receptores nucleares (ANZICK et al., 1997) e cuja amplificação e expressão aumentada têm sido observadas em câncer de mama (KUREBAYASHI et al., 2000). Sua amplificação interfere na transcrição dependente de estrógeno e sua interação com tais receptores caracteriza o gene *AIB1* como um componente importante da via de resposta ao estrógeno, sugerindo que a desregulação de expressão do mesmo resulte numa vantagem seletiva para o crescimento tumoral (KUREBAYASHI et al., 2000). Além disso, foi observado que a inativação de *AIB1* suprime a iniciação, progressão e formação de metástases mamárias induzidas pelo oncogene RAS em camundongos que apresentam taxas normais, elevadas, ou baixas de hormônios ovarianos. Estas observações sugerem que o gene *AIB1* atua como um oncogene, cuja via de sinalização pode conter alvos úteis para prevenção e tratamento do câncer de mama (KUANG et al., 2004).

O gene *BTAK*, localizado em 20q13 (SEN et al., 1997), codifica uma proteína pertencente à família das serinas/treoninas quinases. A fosforilação dos resíduos de serina e treonina está envolvida no controle de diversos processos celulares, incluindo a amplificação centromérica necessária à regulação da segregação cromossômica (COHEN et al., 1989). Falhas neste processo parecem ter um papel importante na transformação neoplásica por aumentar a incidência de mitoses

multipolares e aneuploidias e conseqüentemente levar à instabilidade genômica (NIGG, 2002). A amplificação e expressão aumentada do gene *BTAK* têm sido relatadas em cânceres de mama, podendo representar um evento inicial na carcinogênese mamária, resultando em transformação maligna através da indução de instabilidade genética (PIHAN et al., 2003; ROYCE et al., 2004; WANG et al., 2006). Além disso, descrições de associações positivas entre a expressão aumentada do gene *BTAK* com tumores de alto grau histológico e negativos para receptores de estrógeno e progesterona, sugerem que este evento possa indicar um pior prognóstico e resistência à terapia endócrina (MIYOSHI et al., 2001).

Além dos genes acima mencionados, o oncogene *PTP1B* (*protein tyrosine phosphatase 1B*), como o *AIB1*, localiza-se em 20q12 e tem a função de fosforilar resíduos de tirosina em proteínas, como por exemplo, a codificada pelo proto-oncogene *ERBB2*. Analisando 29 amostras de tumores mamários, WIENER et al. (1994), observaram que a expressão aumentada de *PTP1B* ocorreu em 72,4% dos tumores mamários estudados, atingindo expressão máxima em 37,9% dos mesmos. Foi observada ainda uma associação positiva entre a expressão aumentada dos genes *PTP1B* e *ERBB2*, com a expressão de ambos ocorrendo em 90% dos tumores analisados. Mais recentemente, JULIEN et al. (2007) observaram em tumores mamários de camundongos, induzidos pelo oncogene *ERBB2*, um retardo de desenvolvimento nos animais que não expressaram a proteína Ptpn1 ou nos quais um inibidor de *PTP1B* foi administrado. Estes achados sugerem que o gene *PTP1B* possa atuar na proteção do desenvolvimento de metástases mamárias, podendo ser um novo e potencial alvo terapêutico para pacientes com neoplasia mamária.

Ganhos do número de cópias no cromossomo 16 foi a terceira alteração mais freqüente nos tumores primários estudados no presente estudo, sendo observada em 16 dos 20 (80%) casos estudados. Ganhos em todo o cromossomo 16 ocorreram em 10 dos 20 (50%) casos, ganhos em 16p ocorreram em 5 (25%) casos e ganho em 16q22~qter em 2 (10%) casos. A única perda de segmentos cromossômicos foi detectada na região 16q13~qter.

Alta freqüência de ganhos em 16p foi previamente descrita em diversos estudos (TIRKKONEN et al., 1998; ROYLANCE et al., 1999; LOVEDAY et al., 2000; FUNG et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2002; CAVALLI et al., 2003; RENNSTAM et al., 2003; KORSCHING et al., 2004; STANGE et al., 2006). No entanto, a alta freqüência de ganho do número de cópias de todo o cromossomo 16 observada neste estudo, não foi descrita previamente. Na maioria dos trabalhos a alteração mais freqüentemente observada é a perda em 16q (NISHIKAZI et al., 1997; TIRKKONEN et al., 1998; CLETON-JANSEN, 2002; TEIXEIRA et al., 2002; RENNSTAM et al., 2003; ; ROYLANCE et al., 2006; STANGE et al., 2006). Admite-se que a freqüência elevada dessa alteração tenha importância individual no desenvolvimento do câncer mamário, e especula-se que a presença simultânea do ganho em 1q e perda em 16q esteja associada a etapas iniciais da tumorigênese mamária (TIRKKONEN et al., 1998; BUERGER et al., 2000) e a fatores prognósticos favoráveis, como a presença de receptores de estrógeno e progesterona e uma taxa de sobrevida geral maior do que em outros pacientes (RENNSTAM et al., 2003; FARABEGOLI et al., 2004). No nosso estudo apenas um caso apresentou perda em 16q (16q13~qter) o que não permite avaliações consistentes. Em consequência das freqüentes observações de perdas de segmentos cromossômicos no braço longo do cromossomo 16, como acima mencionado, são comuns os trabalhos que objetivam a

localização de genes supressores de tumor nesta região (KUMAR et al., 2005; VAN WEZEL et al., 2005; RAKHA et al., 2006; ROYLANCE et al., 2006) principalmente pela análise de perda de heterozigiosidade (FRENGEN et al., 2000; DROUKAKOU et al., 2001; CLETON-JANSEN et al., 2002; 2004).

Ao contrário, em 16p objetiva-se, principalmente a localização de oncogenes. Após definir uma pequena região de ganho em 16p (16p11.2), cuja alteração esteve presente em todos os 40 cânceres de mama invasivos com ganho em 16p, STANGE et al. (2006) identificaram quatro genes nesse segmento cromossômico, com possível envolvimento na patogênese tumoral mamária: *RNF40*, *BCL7C*, *FUS* e *ITGAX*. Porém, apenas os genes *BCL7C* e *FUS* foram observados com expressão significativamente aumentada em carcinomas lobulares invasivos pelos mesmos autores. O gene *BCL7C* é semelhante ao gene *BCL7A* (12q24.1), cuja função está associada ao controle da apoptose e foi clonado em linhagem celular proveniente de Linfoma de Burkitt, contendo uma translocação complexa t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) (ZANI et al., 1996). O gene *FUS* (16p11), por sua vez, está envolvido na translocação t(12;16)(q13;p11) com o gene *CHOP* (12q13), gerando uma proteína de fusão FUS/CHOP que se comporta como uma ativadora transcricional com capacidade de transformação celular *in vitro* em liposarcomas (ZINSZNER et al., 1994; SCHWARZBACH et al., 2004) e cuja identificação tem sido considerada importante para o diagnóstico dos mesmos (RIVERO et al., 2006). Apesar destas informações, o envolvimento de ambos os genes em cânceres de mama necessita de melhor esclarecimento.

Um maior número de estudos, analisando detalhadamente o braço curto do cromossomo 16 é necessário, para a identificação e definição das regiões que apresentam genes amplificados e/ou com expressão aumentada, o que poderá

permitir o esclarecimento da participação dessa região cromossômica na tumorigênese mamária.

## **5.2. Alterações Cromossômicas Frequentes em Linfonodos Sentinela**

Nas amostras de linfonodos sentinela, os cromossomos observados neste estudo com maior número de alterações foram os cromossomos 1 (23 – 12,2%) com 17 ganhos e seis perdas, 6 (18 – 9,6%) com seis ganhos e 12 perdas e 19 (14 – 7,4%) com 14 ganhos (Tabela 7 e Gráficos 4 a 6).

Dos 17 ganhos encontrados no cromossomo 1, oito (47%) ocorreram na região 1p32~pter, três (17,6%) em 1q22~qter e seis (35,3%) ocorreram em regiões diferentes observadas em apenas um caso. Das seis perdas detectadas, três (50%) envolveram regiões específicas diferentes (-1p21~pter, -1p22~32 e -1p34.2~p21) que foram observadas em casos distintos (casos 4, 14 e 20, respectivamente), duas (33,3%) ocorreram em 1p31~p22 (casos 3 e 13), e uma perda envolveu o braço curto inteiro do cromossomo 1 (caso 6).

Como nos tumores primários, ganhos em 1q foram também observados por outros autores em lesões metastáticas. NISHIKAZI et al. (1997) encontraram uma frequência superior a 35% de ganhos em 1q em linfonodos axilares de 11 pacientes com tumores primários de mama. Nas 29 amostras de metástases estudadas por KUUKASJÄRVI et al. (1997a) correspondentes a tumores primários de mama, localizados em diversos sítios anatômicos (incluindo linfonodos regionais, área supraclavicular, pulmão, cavidade abdominal, medula óssea e outros), foi encontrada uma frequência de 52% de ganhos em 1q e 28% de perdas em 1p.

Alterações no número de cópias do DNA no cromossomo 6 foi a segunda alteração mais freqüente observada em linfonodos sentinela neste estudo, sendo que 10 das 12 (83%) perdas encontradas corresponderam à região 6q13~23. Perdas em 6q, também foram encontradas por outros autores, com freqüências variáveis: superior a 35% (NISHIKAZI et al.,1997) e 17% em 6cen~q22 (KUUKASJÄRVI et al., 1997a).

Estudos investigando a perda de heterozigosidade nesta região, levaram à identificação de alguns genes supressores tumorais. BILANGES et al. (1999) analisaram a possível inativação do gene *ZAC*, o qual está localizado em 6q24-q25, em oito linhagens celulares de câncer de mama e em 45 tumores primários. Nenhuma mutação foi detectada na região codificadora do gene *ZAC* nos 45 tumores primários, porém, as linhagens celulares mostraram redução ou ausência de expressão deste gene, sugerindo que o mesmo esteja envolvido no processo de carcinogênese mamária. ZELLER et al. (2003) identificaram um possível gene supressor em 6q24.3, denominado *SASH1*. Este gene apresentou expressão reduzida em 74% dos tumores de mama em comparação com o tecido epitelial mamário normal. Mutações na região codificadora deste gene não foram identificadas, levando os autores a sugerir que outros mecanismos, como por exemplo, metilação da região promotora do gene *SASH1*, podem ser responsáveis pela perda da expressão do mesmo em tumores primários e metastáticos.

Outro gene candidato, localizado em 6q23~24 é o *HIVEP2*, que pertence à uma família de genes que codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição. O nível de expressão protéica deste gene foi descrito como significativamente reduzido em cânceres de mama em relação ao tecido normal,

sugerindo que este possa ser um dos eventos genéticos a contribuir para o câncer de mama (FUJII et al., 2005).

A terceira alteração mais freqüente em linfonodos sentinela encontrada neste estudo, ganhos no cromossomo 19, foi identificada em 13 dos 20 (65%) casos analisados. No entanto, alterações neste cromossomo não foram observadas por nenhum dos estudos citados anteriormente (NISHIKAZI et al., 1997; KUUKASJÄRVI et al., 1997a).

O gene *RAI*, localizado em 19q13.2, codifica um inibidor do regulador transcricional NF $\kappa$ B estando, portanto, possivelmente envolvido no controle transcricional, mais precisamente no controle da divisão celular e/ou apoptose (YANG et al., 1999). O aumento da atividade de NF $\kappa$ B tem sido associado com diversos tipos de câncer (revisado por RAYET et al., 1999), o que pode ocorrer devido à baixa concentração ou deficiência funcional do produto do gene *RAI* (GILMORE et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que NF $\kappa$ B regula a transcrição do gene *BRCA2* (WU et al., 2000), um dos genes que confere pré-disposição ao câncer de mama. Para verificar o envolvimento do gene *RAI* em cânceres de mama, NEXO et al. (2003) investigaram a ocorrência desta neoplasia com relação a sete SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismo em um único nucleotídeo) na região 19q13.2 em 425 casos, encontrando um haplótipo específico associado a um alto risco de desenvolvimento de câncer de mama observado em mulheres pós-menopausa com idade inferior a 55 anos. Utilizando cinco dos sete SNPs do trabalho citado anteriormente, VOGEL et al. (2004) observaram que o mesmo haplótipo também está associado com o risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pulmão.

O gene *CAG*, situado em 19q13.4, também tem sido associado ao câncer de mama, através de sua expressão diferencial. Este gene foi observado com níveis superiores de expressão em tecidos tumorais em relação aos tecidos mamários normais (YOUSEF et al., 2004).

Estudos relatando alterações recorrentes no cromossomo 19, como já referido, não são freqüentes em carcinomas mamários, permanecendo desconhecido o papel destas alterações e correspondentes genes envolvidos nestes tumores.

### **5.3. Comparação dos Resultados em Tumores Primários e Linfonodos Sentinela Correspondentes**

Nos 20 casos estudados neste trabalho, as alterações cromossômicas observadas foram comparadas entre os tumores primários e metástases em seus linfonodos sentinela correspondentes. Este tipo de comparação foi realizado em ambos os grupos dentro de um mesmo caso, e de caso para caso.

Estudos na literatura também realizaram comparações de alterações genéticas entre lesões primárias e metastáticas com o objetivo de definir se o mesmo padrão de alterações ocorre em ambos os tecidos, se há alterações nos tumores primários que predispõem a ocorrência de metástases ou se há alterações apenas em metástases e não em tumores primários (BERNARDINO et al., 1997; KUUKASJÄRVI et al. 1997a; NISHIKAZI et al., 1997; PANDIS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002). No entanto, até o momento, apenas um estudo com tal objetivo específico foi realizado em linfonodos sentinela correspondentes (CAVALLI et al., 2003), o qual analisou seis dos casos do presente estudo.

No presente estudo, foi observado um número maior de alterações cromossômicas em tumores primários (220) do que em metástases em linfonodos sentinela (188). Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $t = 0,88$ ;  $P > 0,30$ ). Da mesma forma, não foram estatisticamente significativas as diferenças entre as médias do número de alterações cromossômicas quando foi considerado, separadamente, ganhos e perdas, comparando tais alterações entre ambos os grupos estudados, dentro dos 20 casos estudados ( $t = 1,73$ ;  $P > 0,05$  e  $t = 0,19$ ;  $P > 0,80$ , respectivamente) e dentro dos 21 cromossomos analisados ( $t = 1,01$ ;  $P > 0,30$  e  $t = 0,17$ ;  $P = 0,80$ ).

Em 10 dos 20 (50%) casos analisados foi observada uma maior frequência relativa de alterações cromossômicas em tumores primários do que em metástases de linfonodos sentinela. NISHIKAZI et al. (1997) ao comparar em 11 pares de tumores primários e suas metástases em linfonodos axilares, observaram um número maior de alterações cromossômicas nos linfonodos quando comparados com os tumores primários. Estudos citogenéticos anteriores indicaram uma relação clonal entre as alterações cromossômicas presentes em tumores primários e suas metástases linfonodais correspondentes. No entanto, as alterações nos linfonodos são descritas como geralmente geneticamente menos heterogêneas do que as presentes nos tumores primários. Esta constatação é possivelmente resultante da pressão seletiva a que as células malignas são submetidas durante a progressão tumoral, sendo que apenas um ou poucos dos múltiplos clones que estão presentes nos tumores primários, metastatizam (TEIXEIRA et al., 1996b; PANDIS et al. 1998; ADEYINKA et al. 2000).

Em 15 dos 20 (75%) casos foi observada pelo menos uma alteração cromossômica em comum entre as amostras pareadas (Tabela 9). Frequências

semelhantes foram descritas por KUUKASJÄRVI et al. (1997a), que identificaram relação clonal em 70% das metástases e dos cânceres primários correspondentes e 30% de divergência. Entre as alterações observadas em comum nos dois grupos estudados por estes autores estão: ganhos em 1q, 3q26qter, 6p22, 7p21~qter, 8q17q22~q24 e perdas em Xp, 8p, 9p, 11q14~qter, 13cen~q14, 16q, 17p e 22q.

Em nosso estudo, as alterações mais comuns em ambas os grupos foram: ganhos nos cromossomos 19 (8 casos), 16 (5 casos), 1p32~pter (4 casos), 20 (4 casos), 17 (4 casos), 12q23~qter (3 casos), 1q22~qter (2 casos), 18p (2 casos) e perdas em 13q13~32 (5 casos), 6q13~q23 (4 casos), 2q22~q34 (2 casos). As demais alterações compartilhadas entre os dois grupos de tumores estudados foram observadas em apenas um caso (tabela 9). Ganhos em 1q e 17q, e perdas em 6q e 13q foram descritas por NISHIKAZI et al. (1997) como alterações freqüentes em tumores de mama primários e nos linfonodos axilares correspondentes. As mesmas também foram observadas em tumores primários pareados com tumores metastáticos localizados em diferentes sítios anatômicos por KUUKASJÄRVI et al. (1997a), indicando uma íntima relação clonal entre essas lesões.

Ganhos de todo o cromossomo 16, 17, 19 e 20, em 12q23~qter e em 18p e perda em 2q22~q34 observados no presente estudo, não foram alterações comumente compartilhadas por tumores primários e metastáticos de mama nos trabalhos descritos na literatura (NISHIKAZI et al.,1997; KUUKASJÄRVI et al.,1997a).

Os nossos dados e os descritos na literatura, permitem inferir que ganhos em 1q e 17q e perdas em 6q e 13q ocorrem em estágios iniciais da carcinogênese mamária, precedendo alterações mais complexas que ocorrem durante a progressão metastática. Mais estudos, comparando neoplasias primárias e sítios metastáticos

correspondentes, devem ser realizados para confirmar o possível envolvimento da presença adicional de todo o cromossomo 16, 17, 19 e 20, de ganhos em 12q23~qter e 18p e de perdas em 2q22~q34, que foram observadas em alta frequência em nosso estudo.

Das 220 alterações cromossômicas detectadas nos 20 casos de tumor primário, 45 (20,5%) foram observadas em somente um caso, em um dos grupos analisados. Frequência semelhante foi observada nos linfonodos sentinela (37/188 = 19,7%) (tabela 11). As alterações encontradas neste trabalho em somente um dos grupos analisados (tumor primário ou linfonodo sentinela) sugerem que as mesmas tenham se originado ao acaso e podem representar uma heterogeneidade genética intratumoral, como relatado anteriormente por NISHIKAZI et al. (1997).

As alterações cromossômicas encontradas no presente estudo distribuíram-se homogeneamente entre tumores primários e metástases em linfonodos sentinela nos 21 cromossomos analisados ( $\chi^2_{20} = 12,34$ ;  $P > 0,90$ ). Porém, quando a mesma comparação foi realizada entre os 20 casos estudados observou-se que as alterações cromossômicas não distribuíram-se homogeneamente ( $\chi^2_{19} = 45,09$ ;  $P < 0,001$ ). Os valores de qui-quadrado parciais obtidos nos casos 11, 15, 19 e 20 foram os principais responsáveis por esta diferença significativa. Na tentativa de estabelecer uma associação entre estes dados e as informações clínico-histopatológicas disponíveis (tabela 1), foi observado que as pacientes correspondentes aos quatro casos referidos (casos 11, 15, 19 e 20) apresentam o mesmo tipo de tumor (CDI); três destas (casos 11, 15 e 19) apresentam o mesmo grau histológico (II), e uma (caso 20) apresenta grau histológico diferente (III). A idade média ( $60 \pm 11,9$  anos) e o tamanho médio dos tumores ( $2,83 \pm 2,45$  cm) das

quatro pacientes não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $t = 0,51$ ;  $P > 0,50$  e  $t = 0,52$ ;  $P > 0,50$ ) quando comparados com os mesmos dados da amostra total ( $56,65 \pm 11,95$  anos e  $3,51 \pm 2,28$  cm, respectivamente). Foi observado ainda, que maior ou menor frequência de alterações cromossômicas destes quatro casos não ocorreram sistematicamente nos tumores primários ou nas metástases em linfonodos sentinela, já que em tumores primários a maior frequência de alterações cromossômicas foi observada nos casos 11 e 19, enquanto que nas metástases em linfonodos sentinela a mesma foi observada nos casos 15 e 20. Portanto, sugere-se que a diferença estatística observada entre os 20 casos estudados seja casual, não estando relacionada aos parâmetros clínico-histopatológicos das pacientes ou à frequência de alterações cromossômicas observadas.

Como referido em Resultados, as informações obtidas através do teste de qui-quadrado foram melhor definidas ao aplicarmos aos dados a análise do coeficiente de correlação que indicou independência entre o número de ganhos dos tumores primários e das metástases em linfonodos sentinela, assim como, entre o número de perdas e entre o número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas), separadamente, de ambos os tecidos nos 20 casos. Para as três comparações citadas, os valores obtidos não foram significativos, indicando que as variações do número de alterações cromossômicas ocorrem independentemente. No entanto, valores significativos foram obtidos quando as mesmas três variáveis especificadas acima foram consideradas quanto ao número de alterações por cromossomo. Estes resultados indicam que há uma correlação positiva entre a ocorrência do número de alterações cromossômicas por cromossomo nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela, ou seja, cromossomos que

apresentaram maior número de alterações (sejam ganhos, perdas ou o número total de alterações) em tumores primários, apresentaram maior número de alterações em linfonodos sentinela o mesmo ocorrendo com aqueles que apresentaram menor número de alterações (gráficos 7 a 9). Embora estas informações sejam de interesse, as mesmas devem ser avaliadas com maior precisão para que possam ser interpretadas com mais consistência biológica.

As informações disponíveis neste estudo não permitiram que correlações entre alterações cromossômicas e os dados clínico-histopatológicos pudessem ser realizadas. Apenas analisamos a correlação entre o número de alterações cromossômicas e o tamanho do tumor, não tendo sido observada significância estatística, indicando que as variações do número de alterações cromossômicas e do tamanho do tumor são independentes ( $r = -0,01$ ,  $t = 0,04$ ;  $P > 0,90$ ).

Considerando as freqüentes diferenças dos tipos de alterações citogenéticas observadas nesse estudo e nos demais, a diversificação clonal e a heterogeneidade genética parecem ser características proeminentes da progressão do câncer de mama e do processo metastático. É provável que esta diversidade resulte da instabilidade genética característica das células de câncer de mama e que são reforçadas pela pressão seletiva a qual estas células são submetidas nos diferentes microambientes. Além disso, esses resultados indicam que em muitos casos os clones celulares dos tumores primários e metástases divergem em estágios iniciais da progressão tumoral e evoluem subseqüentemente de maneira independente, de modo que clones progenitores de origem comum não possam ser detectados (KUUKASJÄRVI et al., 1997a).

Alterações presentes exclusivamente nas amostras originadas de sítios metastáticos podem indicar mecanismos moleculares que desencadeiam uma

vantagem seletiva das células metastáticas (KUUKASJÄRVI et al., 1997a). No entanto, não foi possível definir nesse estudo, alterações cromossômicas recorrentes e exclusivas das amostras de linfonodos sentinela, devido a grande diversidade de alterações ocorrendo aparentemente ao acaso. Dessa forma, com base nos estudos de amostras pareadas realizados até o momento, podemos sugerir que um modelo genético simplificado, como o sugerido para a tumorigênese do câncer colorretal (VOGELSTEIN et al., 1988), não é suficiente para explicar a tumorigênese mamária. Segundo este modelo, os tumores de câncer colorretal se iniciam por mutações no gene supressor **APC** (localizado em 5q), resultando em alterações do produto protéico e proliferação celular anormal. Um segundo evento poderia ocorrer por uma nova mutação no alelo selvagem remanescente do **APC**. Em seguida, ocorre uma hipometilação do DNA, com a conversão de uma das células do epitélio hiperproliferativo em um pequeno tumor benigno (adenoma). Nestas células tumorais benignas freqüentemente ocorre ativação do gene **KRAS** (localizado em 12p), levando à proliferação aumentada e aumento do volume tumoral. Mutações seqüenciais no gene **DCC** (localizado em 18q e deletado em 88% dos carcinomas colorretais) levam à displasia, adenoma viloso e, finalmente, ao estado canceroso. A transição de adenoma avançado para carcinoma é acompanhada de mutações no gene **TP53** (localizado em 17p). Outras alterações seriam necessárias para que as células tumorais adquirissem a capacidade de invasão, conferindo maior malignidade.

Os resultados de nossas análises iniciais demonstram claramente a necessidade de que sejam intensificados os estudos em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela correspondentes, para a caracterização das alterações genéticas e epigenéticas presentes nos primeiros. Esta caracterização é

de grande importância por possibilitar o reconhecimento de alterações relacionadas ao processo inicial de metastatização mamária, diferenciando-as das que ocorrem nos sítios metastáticos mais distantes. Estudos moleculares, empregando técnicas de microarranjos, por exemplo, em amostras com significativa quantidade de células metastáticas, obtidas por métodos de microdissecção celular, como *Laser Capture Microdissection* (LCM), são essenciais para estas análises. Assim que informações quantitativa e qualitativamente apropriadas sejam obtidas, maiores serão as possibilidades de se poder prever com segurança quais os pacientes, com envolvimento do linfonodo sentinela, apresentam risco aumentado de comprometimento de outros nódulos axilares. A caracterização das alterações cromossômicas em metástases nos linfonodos sentinela poderá auxiliar para um melhor entendimento da história natural e do comportamento biológico e clínico dos tumores malignos, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de novos métodos de determinação de fatores preditivos e prognósticos no câncer de mama (CAVALLI e CAVALLI, 2007).

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos da análise de 20 tumores primários de mama e seus linfonodos sentinela correspondentes, utilizando o método Hibridização Genômica Comparativa (CGH), concluímos que:

- Os cromossomos com maior número de alterações nas amostras de tumor primário foram: 1 (24 - 11,0%) com 18 ganhos e seis perdas, 20 (20 - 9,1%) com 20 ganhos e 16 (18 - 8,2%) com 17 ganhos e uma perda,
- Os cromossomos com maior número de alterações nas amostras de linfonodo sentinela foram: 1 (23 - 12,2%) com 17 ganhos e seis perdas, 6 (18 - 9,6%) com seis ganhos e 12 perdas e 19 (14 - 7,4%) com 14 ganhos,
- As alterações mais comuns encontradas em ambos os grupos estudados foram: ganhos nos cromossomos 19 (8 casos), 16 (5 casos), 1p32~pter (4 casos), 20 (4 casos), 17 (4 casos), 12q23~qter (3 casos), 1q22~qter (2 casos), 18p (2 casos) e perdas em 13q13~32 (5 casos), 6q13~q23 (4 casos), 2q22~q34 (2 casos),
- Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias de ganhos, de perdas e do número total de alterações cromossômicas quando foram comparadas, separadamente, entre os tumores primários e metástase em linfonodos sentinela,

- Ganhos em 1q e 17q e perdas em 6q e 13q, freqüentes no presente estudo e nos descritos na literatura, possivelmente ocorrem em estágio inicial da carcinogênese mamária, precedendo a aquisição de mudanças mais complexas durante a progressão e recorrência metastática,
- Um grande número de genes envolvidos na proliferação e/ou diferenciação da célula mamária estão mapeados nas regiões alteradas nos casos analisados no presente estudo. Metodologias de análise de expressão gênica e protéica deverão definir o real envolvimento dos mesmos em cada uma das etapas do processo de carcinogênese mamária.
- Um modelo de progressão tumoral mamária não pode ser inferido, devido à grande variedade de alterações ocorrendo aparentemente ao acaso em ambas as amostras analisadas,
- O grande número de alterações cromossômicas isoladas encontradas sugere que esta diversidade resulta da instabilidade genética característica das células de câncer de mama reforçadas pela pressão seletiva a que estas células estão submetidas nos diferentes microambientes de crescimento, além de uma possível divergência clonal ocorrendo em estágios iniciais da progressão tumoral, o que determina a evolução independente dos clones celulares de tumores primários e de lesões metastáticas,

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RASOOL, S.; KIDSON, S.H. et al. An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 289-297, 2006.

ADEYINKA, A. MERTENS, F. et al. Cytogenetic heterogeneity and clonal evolution in synchronous bilateral breast carcinomas and their lymph node metastases from male patient without any detectable BRCA2 germline. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 118, p. 42-47, 2000.

ALBERTINI, J.J.; LYMAN, G.H. et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 276, p. 1818-1822, 1996.

ALBERTS, B.; JOHNSON, I. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ANZICK, S.L.; KONONEN, J. et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. **Science**, v. 277, p. 965-968, 1997.

AUBELE, M.; AUER, G. et al. Chromosomal imbalances are associated with metastasis-free survival in breast cancer patients. **Analytical Cellular Pathology**, v. 24, p. 77-87, 2002.

BAAK, J.P.A.; PATH, F.R.C. et al. Genomics and proteomics in cancer. **European Journal of Cancer**, v.39, p.1199-1215, 2003.

BAYLIN, S.B.; STELLER, M. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Human Molecular Genetics**, v.10, p. 687-692, 2001.

BECKMANN, M.W.; NIEDERACHER, H.G. et al. Tumor risk consultation for predisposed women from high risk cancer families. **Journal of Molecular Medicine**, v.75, p.429-439, 1997.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestística**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1988.

BERNARDINO, J.; GERBAULT-SEUREAU, M. et al. Unusual clonal chromosomal evolution in a breast carcinoma and its lymph node metastasis in a patient with Down syndrome. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.19, p.195-199, 1997.

BERNINI, S.; SPENCER, M. et al. Evidence for colorectal cancer micrometastases using reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of MUC2 in lymph nodes. **Cancer Detection and Prevention**, v. 24, p. 72-79, 2000.

BILANGES, B.; VARRAULT, A. et al. Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. **Oncogene**, v. 18, p. 3979-3988, 1999.

BLANCHARD, D.K; DONOHUE, J.H. et al. Relapse and morbidity in patients undergoing sentinel lymph node biopsy alone or with axillary dissection for breast cancer. **Archives of Surgery**, v.138, p.482-488, 2003.

BOCKMUHL, U.; WOLF, G. et al. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 20, p.145-151, 1998.

BORGSTEIN, P.J.; PIJPERS, R. et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: guidelines and pitfalls of lymphos and gama probe detection. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 186, p. 275-283, 1998.

BREASTCANCER.ORG – A NONPROFIT ORGANIZATION FOR BREAST CANCER EDUCATION. Disponível em <<http://www.breastcancer.org> > Acesso em: 14 jul 2005.

BRODIE, A.M., LI, Q. et al. Aroatase ans COX-2 expression in human breast cancers. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, p. 41-47, 2001

BUERGER, H. MOMMERS, E.C. et al. Correlation of morphologic and cytogenetic parameters of genetic instability with chromosomal alterations in situ carcinomas of the breast. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, p. 854-859, 2000.

BUERGER, H.; SCHMIDT, H. et al. Genetic characterisation of invasive breast cancer: a comparison of CGH and PCR based multiplex microsatellite analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 836 – 840, 2001.

BUFFART, T.E.; COFFA, J. et al. DNA copy number changes at 8q11-24 in metastasized colorectal cancer. **Cellular Oncology**, v. 27, p. 57-65, 2005.

CABANAS, R.M. An Approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer**, v.39, p. 456-466, 1977.

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

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei. **Experimental Cell Research**, v. 61, p. 472-474, 1970c.

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

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

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Experimental Cell Research**, v.62, p.480-492, 1970e.

CAVALLI, L.R.; URBAN, C.A. et al. Genetic and epigenetic alterations in sentinel lymph nodes metastatic lesions compared to their corresponding primary breast tumors. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v.146, p.33-40, 2003.

CAVALLI, L. R.; CAVALLI, I.J. Citogenética e genética molecular dos tumores mamários. In: RIETJENS, M.; URBAN, C.A. **Cirurgia da Mama**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2007. 28-45.

CHAGPAR, A.; MIDDLETON, L.P. et al. Clinical outcome of patients with lymph node-negative breast carcinoma who have sentinel lymph node micrometastases detected by immunohistochemistry. **Cancer**, v. 103, p. 1581-1586, 2005.

CHAUDHARY, J.; SCHMIDT, M. The impact of genomic alterations on the transcriptome: a prostate cancer cell line case study. **Chromosome Research**, v. 14, p. 567-586, 2006.

CHEN, X.; KNAUF, J.A. et al. From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genome hybridization. **American Journal of Human Genetics**, v. 63, p. 625-637, 1998

CHUNG, M.A.; STEINHOFF, M.M. et al. Clinical axillary recurrence in breast cancer patients after a negative sentinel node biopsy. **American Journal of Surgery**, v. 184, p. 310-314, 2002.

CINGOZ, S.; ALTUNGOZ, O. et al. DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 145, p. 108-114, 2003.

CLEMONS, M.; DANSON, S. et al. Locoregionally recurrent breast cancer: incidence, risk factors, and survival. **Cancer Treatment Review**, v.27, p. 67-82, 2001.

CLETON-JANSEN, A.M. E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? **Breast Cancer Research**, v.4, p. 5-8, 2002.

CLETON-JANSEN, A.M.; BUERGER, H. et al. Different mechanisms of chromosome 16 loss of heterozygosity in well- versus poorly differentiated ductal breast cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 41, p. 109-116, 2004.

COHEN, P. The structure and regulation of protein phosphatases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 453-508, 1989.

COLLINS, C.; ROMMENS, J.M. et al. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8703-8708, 1998.

COOPER, G. M. **Elements of human cancer**. 1. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1994.

COURJAL, F.; THEILLET, C. Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. **Cancer Research**, v. 57, p. 4368-4377, 1997.

COX, C.E.; PENDAS, S. et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 227, p. 645-651, 1998.

CROPP, C. S. Mutations in breast cancer. **Cancer Letters**, v.90, p.51-56, 1995.

DATI, C.; MUJRACA, R. et al. C-erbB-2 and ras expression levels in breast cancer are correlated and show a co-operative association with unfavorable clinical outcome. **International Journal of Cancer**, v. 47, p.833-838, 1991.

DROUFAKOU, S. DESHMANE, V. et al. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 404-408, 2001.

EL KORN, J. F.; TROENDLE, L. M. et al. Controlling the number of false discoveries: Application to high dimensional genomic data. Technical Report 3, Biometric Research Branch, **National Cancer Institute**, 2003.

ESTELLER, M.; CORN, P.G. et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**, v.61, p. 3225-3229, 2001.

ESTOURGIE, S.H.; TANIS, P.J. et al. Should the hunt for internal mammary chain sentinel nodes begin? An evaluation of 150 breast cancer patients. **Annals of Surgery Oncology**, v.10, p. 935-941, 2004.

FARABEGOLI, F.; HERMSEN, M.A.J.A. et al. Simultaneous chromosome 1q gain and 16 q loss is associated with steroid receptor presence and low proliferation in breast carcinoma. **Modern Pathology**, v. 17, p. 449-455, 2004.

FEINBERG, A.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, v. 132, p. 6-13, 1983.

FIGUEIREDO, B.C.; STRATAKIS, C.A. et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 84, p.1116-1121, 1999.

FRENGEN, E.; ROCCA-SERRA, P. et al. High-resolution integrated map encompassing the breast cancer loss of heterozygosity region on human chromosome 16q22.1. **Genomics**, v. 70, p. 273-285, 2000.

FRIDLAND, J.; SNIJDERS, A. et al. Breast tumor copy numbers aberration phenotypes and genomic instability. **BioMed Central Cancer**, v. 6, p. 1-13, 2006.

FUJII, H.; GABRIELSON, E. et al. Frequent down-regulation of HIVEP2 in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 91, p. 103-112, 2005.

FUNG, I-f.; WONG, n. et al. Genetic imbalances in pT2 breast cancers of southern Chinese women. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v. 124, p. 56-61, 2001.

GARNE, J. P.; ASPEGREN, K. et al. Increasing incidence of and declining mortality from breast carcinoma. **Cancer**, v.79, p. 69-74, 1997.

GENTILINI, O.; TRIFIRÒ, G. et al. Sentinel lymph node biopsy in multicentric breast cancer. The experience of the European Institute of Oncology. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 32, p. 507-510, 2006.

GEORGIADES, I.B.; CURTIS, L.J. et al. Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. **Oncogene**, v. 18, p. 7933-7940, 1999.

GILMORE, T.D.; CORMIER, C. et al. Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. **Oncogene**, v.25, p. 7098-7103, 2001.

GIULIANO, A.E.; KIRGAN, D.M. et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Annals of Surgery**, v.220, p.391-398, 1994.

GIULIANO, A.E.; DALE, P.S. et al. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. **Annals of Surgery**, v. 222, p. 394-401, 1995.

GIULIANO, A.E. Sentinel lymphadenectomy in primary breast carcinoma: an alternative to routine axillary dissection. **Journal of Surgical Oncologic**, v. 62, p.75-77, 1996.

GIULIANO, A.E.; JONES, R.C. et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.15, p. 2345-2350, 1997.

GIULIANO, A.E.; KELEMEN, P.R. et al. Sophisticated techniques detect obscure lymph node metastases in carcinoma breast cancer. **Cancer**, v. 83, p. 391-393, 1998

GIULIANO, A.E.; HAIGH, P.I. et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v.18, p.1553-1559, 2000.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. et al. **Introdução à Genética**. 7.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. 6 edição. São Paulo: Editora Livraria Nobel S.A., 1976.

GOULD, E.A.; WINSHIP, T. et al. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. **Cancer**, v.13, p.77-78, 1960.

GOLSHAN, M.; MARTIN, W.J. et al. Sentinel lymph node biopsy lowers the rate of lymphedema when compared with standard axillary lymph node dissection. **American Surgery**, v. 69, p. 209-211, 2003.

GOYAL, A. NEWCOMBE, R.G. et al. Sentinel lymph node biopsy in patients with multifocal breast cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 30, p. 475-479, 2004.

GUSTERSON, B.A.; GELBER, R.D. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, p. 1049-1056, 1992.

HALSELL, J.T.; SMITH, J.R. et al. Lymphatic drainage of the breast demonstrated by vital dye staining and radiography. *Annals of Surgery*, v.162, p. 221-226, 1965.

HAN, W.; HAN, M-R et al. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **BioMed Central Cancer**, v. 6, p. 1-13, 2005.

HANSEN, N.M.; GRUBE, B.J. et al. Clinical significance of axillary micrometastases in breast cancer: how small is too small? **Proceedings of the American Society of Clinical Oncology**, v.20, p. 91a, 2001.

HELLMAN, S. Natural history of small breast cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v.12, p. 2229-2234, 1994.

HERMSEN, M.A.J.A.; BAAK, J.P.A. et al. Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. **Journal of Pathology**, v.186, p.356-362, 1998.

HILDEBRANDT, M.; MAPARA, M.Y. et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: A sensitive method for monitoring purging efficiency. **Experimental Hematology**, v.25, p. 57-65, 1997.

HODGSON, J.G.; CHIN, K. et al. Genome amplification of chromosome 20q in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 78, p. 337-345, 2003.

HUGHES, S.J.; XI, L.; RAJA, S. et al. A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 243, p. 389-398, 2006.

HUVOS, A.G.; HUTTER, R.V.; BERG, J.W. Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. **Annals of Surgery**, v.173, p. 44-46, 1971.

HYMAN, E.; KAURANIEMI, P. et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. **Cancer Research**, v.62, p.6240-6245, 2002.

ISOLA, J.J.; KALLIONIEMI, O-P. et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 147, p. 905-911, 1995.

JANNINK, I.; VAN DIEST, P.J.; BAAK, J.P. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: Classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. **Human Pathology**, v. 26, p. 1086-1092, 1995.

JANSSEN, E.A.M.; BAAK, J.P.A. et al. In lymph node-negative invasive breast carcinomas, specific chromosomal aberrations are strongly associated with high mitotic activity and predict outcome more accurately than grade, tumour diameter, and oestrogen receptor. **Journal of Pathology**, v. 201, p. 555-561, 2003.

JULIEN, S.G.; DUBÉ, N. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. **Nature Genetics**, 2007 Jan 28; [Epub ahead of print]

KAMBY, C.; RASMUSSEN, B.B.; KRISTENSEN, B. Prognostic indicators of metastatic bone disease in human breast cancer. **Cancer**, v.68, p. 2045-2050, 1991.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. P. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v.258, p.818-821, 1992.

KALLIONIEMI, O. P. ; KALLIONIEMI, A. et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy numbers changes in solid tumors. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 10, p. 231-243, 1994.

KIM, H.J. ; HEERDT, A.S. et al. Sentinel node drainage in multicentric breast cancers. **Breast Journal**, v. 8, p.356-361, 2002.

KRAG, D.N.; WEAVER, D.L. et al. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. **Surgical Oncology**, v. 2, p. 335-339, 1993.

KRAG, D.N.; ASHIKAGA, T. et al. Development of sentinel node targeting technique in breast cancer patients. **Breast**, v. 4, p. 67-74, 1998a.

KRAG, D.N.; WEAVER, D.L. et al. The sentinel node in breast cancer: a multicenter validation study. **The New England Journal of Medicine**, v.339, p. 941-946 1998b.

KOKKE, M.C.; JANNINK, I. et al. Incidence of axillary recurrence in 113 sentinel node negative breast cancer patients: a 3-year follow-up study. **European Journal of Surgical Oncology**, v.31, p. 221-225, 2005.

KORSCHING, E.; PACKEISEN, J. et al. Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by comparative genomic hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. **Breast Journal of Cancer**, v. 90, p. 1422-1428, 2004.

KUANG, S.Q; LIAO, L. et al. AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. **Cancer Research**, v. 64, p. 1875-1885, 2004.

KUMAR, R. NIELSEN, P.M. et al. FBXO31 is the chromosome 16q24.3 senescence gene, a candidate breast tumor suppressor, and a component of an SCF complex. **Cancer Research**, v. 65, p. 11304-11313, 2005.

KUUKASJARVI, T.; KARHU, R. et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. **Cancer Research**, v.57, p.1597-604, 1997a.

KUUKASJARVI, T.; TANNER, M. et al. Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. **American Journal of Pathology**, v.150, p.1465-1471, 1997b.

KUREBAYASHI, J.; OTSUKI, T. et al. Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 512-518, 2000.

LARRAMENDY, M. L.; LUSHNIKOVA, T. et al. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v. 119, p. 132-138, 2000.

LEIDENIUS, M.; KROGERUS, L. et al. Accuracy of axillary staging using sentinel node biopsy or diagnostic axillary lymph node dissection--a case-control study. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, p.264-270, 2004.

LEVAN, A. Non-random representation of chromosome types in human tumor stemlines. **Hereditas**, v.55, p. 28-38, 1966.

LINDHAL, T.; ENGEL, G. et al. Can axillary dissection be avoided by improved molecular biological diagnosis? **Acta Oncology**, v.39, p.319-326, 2000.

LOO, L.W.M.; GROVE, D.I. et al. Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. **Cancer Research**, v. 64, p. 8541-8549, 2004.

LOVEDAY, R. L.; GREENMAN, J. et al. Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridization. **International Journal of Cancer**, v. 15, p. 494-500, 2000.

LU, Y.J.; DONG, X.Y. et al. Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma. **Lung Cancer**, v. 23, p. 61-66, 1999.

MALANEY, S.; DALY, R.J. The Ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and and Neoplasia**, v. 6, 101-113, 2001.

MANDERS, P.; BULT, P. et al. The prognostic value of the mitotic activity index in patients with primary breast cancer who were not treated with adjuvant systemic therapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.77, p. 77-84, 2002.

MANSI, J.L.; GOGAS, H. et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. **Lancet**, v.354, p. 197-202, 1999.

MCNEIL, N. RIED, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 2, p. 1-14, 2000.

MIKHITARIAN, K.; MARTIN, R.H.; MITAS, M. et al. Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study. **Surgery**, v. 138, p. 474-481, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: 17 dez 2006.

MITAS, M.; MIKHITARIAN, K. et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. **International Journal of Cancer**, v.93, p.162-171, 2001.

MITCHELL, E.L.D.; SANTIBANEZ-KOREF, M. 1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 2, p. 278-289, 1990.

MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation Research*, v. 462, 247-253, 2000.

MIYAKIS, S.; SOURVINOS, G.; SPANDIDOS, D.A. Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 609-612, 1998.

MIYOSHI, Y. IWAO, K. et al. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 370-373, 2001.

MORTON, D.L.; WEN, D.R. et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. **Archives of Surgery**, v. 127, p. 392-399, 1992.

NANO, M.T.; KOLLIAS, J. et al. Clinical impact of false-negative sentinel node biopsy in primary breast cancer. **British Journal of Surgery**, 89, p. 1430-1434, 2002.

NAIK, A.M.; FEY, J. et al. The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. **Annals of Surgery**, v. 240, p. 462-468, 2004.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: NIH consensus conference on the treatment of early-stage breast cancer. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 265, p.391-395, 1991.

NATIONAL LYMPHEDEMA NETWORK (NLN). Disponível em : <<http://www.lymphnet.org>> Acesso em 15 jul 2005.

NESSLING, M.; RICHTER, K. et al. Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. **Cancer Research**, v.65, 439-447, 2005.

NEXO, B.A.; VOGEL, U. et al. A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene RAI is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55. **Carcinogenesis**, v.24, p. 899-904, 2003.

NIGG, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Reviews*. **Cancer**, v. 2, p. 815-25, 2002.

NISHIZAKI, T.; DEVRIES, S. et al. Genetic alterations in primary breast cancer and their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 19, p.267-272, 1997.

NISSAN, A.; JAGER, D.; ROYSTACHER, M. et al. Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 94, p. 681-685, 2006.

NONET, G.H.; STAMPFER, M. R. et al. The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 61, p.1250-1254, 2001.

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

O'HEA, B.J.; HILL, A.D. et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: initial experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 186, p. 423-427, 1998.

ORR, R.K. Impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival-a Bayesian meta-analysis. **Annals of Surgery Oncology**, v.6, p. 109-116, 1999.

ORSETTI, B.; NUGOLI, M. et al. Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 1439-1447, 2006.

PANDIS, N.; BARDI, G. et al. Unbalanced t(1;16) as the sole karyotypic abnormality in a breast carcinoma and its lymph node metastasis. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v.75, p.158-159, 1994.

PANDIS, N.; TEIXEIRA, M.R. et al. Cytogenetic comparison of primary tumors and lymphonode metastases in breast cancer patients. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.22, p. 122-129, 1998.

PARGAONKAR, A.S.; BEISSNER, R.S. et al. Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 127, p. 701-705, 2003.

PARKIN, D.M.; BRAY, I. et al. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v.37, p. 4-66, 2001.

PEINTINGER, F.; REITSAMER, R. et al. Comparison of quality of life and arm complaints after axillary lymph node dissection vs sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 648-652, 2003.

PIHAN, G.A.; WALLACE, J. et al. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. **Cancer Research**, v. 63, p. 398-404, 2003.

PINKEL, G.A.; STRAUME, T. GRAY, J. Citogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PINKEL, D.; SEGRAVES, R. et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nature Genetics**, v.20, p.207-211, 1998.

POLLACK, J. SORLIE, T. et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 99, p. 12963-12968, 2002.

POLYAK, K. On the birth of breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1552. p.1-13, 2001.

RAKHA, E.A.; GREEN, A.R. et al. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 45, p. 527-535, 2006.

RAYET, B.; GELINAS, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. **Oncogene**, v.18, p. 6938-6947, 1999.

REDDING, W.H.; COOMBES, R.C. et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. **Lancet**, v. ii, p.1271-1273, 1983.

REINTGEN, D.; MOSER, R.; et al. Sentinel node biopsy in breast cancer: an overview. **Breast Journal**, v.6, p.299-305, 2000.

REIS-FILHO, J.S.; SIMPSON, P.T. et al. The molecular genetics of breast cancer : the contribution of comparative genomic hybridization. **Pathology – Research and Practice**, v. 201, p. 713-725, 2005.

REITSAMER, R.; PEINTINGER, F. et al. Sentinel lymph node biopsy alone without axillary lymph node dissection--follow up of sentinel lymph node negative breast cancer patients. **European Journal of Surgery Oncology**, v. 29, p. 221-223, 2003.

RENNSTAM, K.; AHLSTEDT-SOINI, M. et al. Patterns of chromosomal imbalances defines subgroups of breast cancer with distinct clinical features and prognosis. A study of 305 tumors by comparative genomic hybridization. **Cancer Research**, v. 63, p. 8861-8868, 2003.

RIED, T; KNUTZEN, R. et al. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 15, p. 234-45, 1996.

RIETJENS, M.; URBAN, C.A. **Cirurgia da Mama**. Primeira Edição. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2007.

RIVERO, E.R; MESQUITA, R.A. et al. Detection of TLS/FUS-CHOP fusion transcripts in a case of oral liposarcoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 10, p. 36-38, 2006.

ROSS, J.S.; FLETCHER, J.A. The HER-2;neu oncogene: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 125-138, 1999.

ROUMEN, R.M.; KUIJT, G.P. et al. Treatment of 100 patients with sentinel node-negative breast cancer without further axillary dissection. **British Journal of Surgery**, v. 88, p. 1639-1643, 2001.

ROYCE, M.E.; XIA, W. et al. STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis. **Cancer**, v. 100, p. 12-19, 2004.

ROYLANCE, R.; GORMAN, P. et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. **Cancer Research**, v. 59, p.1433-1436, 1999.

ROYLANCE, R.; GORMAN, P. et al. A comprehensive study of chromosome 16q in invasive ductal and lobular breast carcinoma using array CGH. **Oncogene**, v. 25, p. 6544-6553, 2006.

SAKORAFAS, G.H.; TSIOTOU, A.G.; BALSIGER, B.M. Axillary lymph node dissection in breast cancer: current status and controversies, alternative strategies and future perspectives. **Acta Oncology**, v. 39, p.455-466, 2000.

SCHWARTZ, G.F.; GIULIANO, A.E.; VERONESI, U. Consensus conference committee. Proceedings of the consensus on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast. **Cancer**, v. 94, p. 2542-2551, 2002.

SCHWARZBACH, M.H.; KOESTERS, R. et al. Comparable transforming capacities and differential gene expression patterns of variant FUS/CHOP fusion transcripts derived from soft tissue liposarcomas. **Oncogene**, v. 23, p. 6798-6805, 2004.

SEN, S.; ZHOU, H.; WHITE, R.A. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. **Oncogene**, v. 14, p. 2195-2200, 1997.

SESHADRI, R.; FIRGAIRA, F.A. et al. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. **Journal of Clinical Pathology**, v. 10, p. 1936-1942, 1993.

SHAFFER, L. G.; BEJJANI, B. A. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 221-226, 2004.

SHRENCK, P.; RIEGER, R. et al. Morbidity following sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection for patients with breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 608-614, 2000.

SHRENCK, P.; WAYAND, W. Sentinel-node biopsy in axillary lymph - node staging for patients with multicentric breast cancer. **Lancet**, v. 357, p. 122, 2001.

SIMON, R.; NOCITO, A. et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 1141-1146, 2001.

SIMON, R.; KORN, E. et al. **Design and Analysis of DNA Microarray Investigations**. New York: Springer, 2004.

SINGH, B.; BERRY, J.A. et al. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v.26, p. 1393-1399, 2005.

SHINOZAKI, M.; HOON, D.S.B. et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 2156-2162, 2005.

SLAMON, D. J.; CLARK, G.M. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, p. 177-182, 1987.

SMIDT, M.L.; JANSSEN, C.M.M. et al. Axillary recurrence after a negative sentinel node biopsy for breast cancer: incidence and clinical significance. **Annals of Surgical Oncology**, v. 12, p. 29-33, 2005.

SOLINAS-TOLDO, S.; LAMPEL, S. et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.20, p.399-407, 1997.

SOMIARI, S.B.; SHRIVER, C.D. et al. Global search for chromosomal abnormalities in infiltrating ductal carcinoma of the breast using array-comparative genomic hybridization. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v. 155, p. 108-118, 2004.

SIMON, R.; BURGER, H. et al. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. **The Journal of Pathology**, v. 185, p.345-51, 1998.

STANGE, D.E.; RADLWIMMER, B. et al. High-resolution genomic profiling reveals association of chromosomal aberrations on 1q and 16p with histologic and genetic subgroups of invasive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 345-352, 2006.

STITZENBERG, K.B.; CALVO, B.F. et al. Cytokeratin immunohistochemical validation of the sentinel node hypothesis in patients with breast cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v.117, p. 729-737, 2002.

STRUSKI, S.; DOCO-FENZY, M.; CORNILLET-LEFEBVRE, P. et al. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 135, p. 63-90, 2002.

TAKEI, H. SUEMASU, K et al. Recurrence after sentinel lymph node biopsy with or without axillary, lymph node dissection in patients with breast cancer. **Breast Cancer**, v. 14, p. 16-24, 2007.

TANNER, M.M.; TIRKKOKEN, M. et al. Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. **Cancer Research**, v. 54, p. 4257-4260, 1994.

TANNER, M.M.; TIRKKOKEN, M. et al. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 56, p. 3441-3445, 1996.

TARUSCIO, D.; PARADISI, S. et al. Pancreatic acinar carcinoma shows a distinct pattern of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 28, p. 294-299, 2000.

TEIXEIRA, M.R.; PANDIS, N.; et al. Cytogenetic abnormalities in a situ ductal carcinoma and five prophylactically removed breasts from members of a family with hereditary breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.38, p.177-182, 1996.

TEIXEIRA, M.R.; ANDERSEN, J.A. et al. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. **Cancer Research**, v. 56, p. 855-859, 1996b.

TEIXEIRA, M.R.; PANDIS, N. et al. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.33, p.1-16, 2002.

TIENARI, J; REIMA, I. et al. A cloned human germ cell tumor-derived cell line differentiating in culture. **International Journal of Cancer**, v. 31, p.710-719, 1998.

TIRKKONEN, M.; TANNER, M. et al. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 21, p. 177-184, 1998.

TOUSIMIS, E.; VAN ZEE, K.J. et al. The accuracy of sentinel lymph node biopsy in multicentric and multifocal invasive breast cancers. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 197, p. 529-535, 2003.

TSUCHIYA, A.; SUGANO, K. et al. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastasis from breast cancer. **Acta Oncologica**, v. 35, p. 425-428, 1996.

TUBBS, R.R.; PETTAY, J.D. et al. Discrepancies in Clinical Laboratory Testing of Eligibility for Trastuzumab Therapy: Apparent Immunohistochemical False-Positives Do Not Get the Message. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 2714-2721, 2001.

VAN STEENIS, H. Chromosomes and cancer. **Nature**, v.209, p.819-821, 1966.

VAN WEZEL, T.; LAMBOARETS, M. et al. Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 998-1004, 2005.

VERONESI, U.; GALIMBERTI, V. et al. Sentinel lymph node biopsy as an indicator for axillary dissection in early breast cancer. **European Journal of Cancer**, v.37, p.454-458, 2001.

VERONESI, U.; PAGANELLI, G. et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p. 546-553, 2003.

VERONESI, U.; PAGANELLI, G. et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. **Journal of National Cancer Institute**, v. 91, p.368-373, 1999.

VERONESI, U.; PAGANELLI, G. et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. **Lancet**, v.349, p. 864-867, 1997.

VOGEL, U. LAROS, I et al. Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer. **Mutation Research**, v. 546, p. 65-74, 2004.

VOGELSTEIN, B. FEARON, E.R. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 525-532, 1988.

WANG, C. THOR, A. et al. The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates Ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 567-576, 1998.

WANG, X.; ZHOU, Y.X. et al. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. **Oncogene**, v. 25, p. 7148-7158, 2006.

WEAVER, D.L.; KRAG, D.N. et al. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. **Cancer**, v. 88, p. 1099-1107, 2000.

WEIGELT, B.; VERDUIJN, P. et al. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 1531-1537, 2004.

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.

WEISS, M.M.; HERMSEN, G.A. et al. Comparative genomic hybridization. **Molecular Pathology**, v. 52, p. 243-251, 1999.

WEISS, M.M.; SNIJDERS, A.M. et al. Microarray CGH reveals a narrow gain at 20q13 in human gastric carcinomas. **Gastroenterology**, v.120, p.A1541, 2001.

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

WIDT-LEVERT, L.M.; TJAN-HEINEN, V.C.G. et al. Stage migration in breast cancer: surgical decisions concerning isolated tumour cells and micro-metastases in the sentinel lymph node. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 29, p. 216-220, 2003.

WIENER, J.R.; KERNS, B.J. et al. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, p. 372-378, 1994.

WRIGHT, F.C.; WALKER, J. et al. Outcomes after localized axillary node recurrence in breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v.10, p. 1054-1058, 2003.

WU, K. ; JIANG, S.W. et al. Induction of the BRCA2 promoter by nuclear factor-KB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 35548-35556, 2000.

YANG, J.P.; HORI, M. et al. Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kB, RelA-associated inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15662-15670, 1999.

YOUSEF, G.M.; BORGONÑO, C.A. et al. Molecular cloning of a new gene which is differentially expressed in breast and prostate cancers. **Tumor Biology**, v. 25, p. 122-133, 2004.

ZANI, V.J.; AZOU, N. Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon. **Blood**, v.87, p. 3124-3134, 1996.

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

ZELLER, C.; HINZMANN, B. et al. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. **Oncogene**, v. 22, p. 2972-2983, 2003.

ZINSZNER, H. ALBALAT, R; RON. D. A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. **Genes & Development**, v. 8, p. 2513-2526, 1994.

**ANEXOS**

