

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLARISSA TORRESAN



**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
EM METÁSTASES DE
LINFONODOS SENTINELA MAMÁRIOS**

CURITIBA

2011

CLARISSA TORRESAN

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
EM METÁSTASES DE
LINFONODOS SENTINELA MAMÁRIOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

**Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro**

**Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Regina
Cavalli**

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Torresan, Clarissa

Identificação de marcadores moleculares em metástases de linfonodos sentinela mamário. / Clarissa Torresan. – Curitiba, 2011.

152 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Iglénir João Cavalli

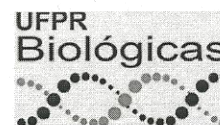
Co-orientador: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Luciane Regina Cavalli

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer 2. Marcadores biológicos de tumor I. Título II. Cavalli, Iglénir João III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza IV. Cavalli, Luciane Regina V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.994



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado a qual se submeteu **CLARISSA TORRESAN**, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de setembro de 2011

Professora Doutora Ilíada Rainha de Souza
UFSC – Membro Titular

Professora Doutora Roberta Losi Guembarovski
UEL – Membro Titular

Professor Doutor Roberto Rosati
Instituto Pelé/Pequeno Príncipe – Membro Titular

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Depto Genética/UFPR – Membro Titular

Professor Doutor Iglénir João Cavalli
UFPR – Orientador e Presidente da banca

Visto

Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Vice-Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética

Dedicado a todas as pessoas que enfrentam o câncer de mama, especialmente
àquelas que lutaram, porém sucumbiram.
Minha esperança e meu saber para que possamos vencer sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Iglenir João Cavalli* e à *Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro*, pela oportunidade e orientação científica, além da amizade, carinho e compreensão.

À *Profa. Dra. Luciane Regina Cavalli* e ao *Prof. Dr. Bassem Haddad*, pela oportunidade de realização da parte experimental deste trabalho na Universidade de Georgetown, e por todas as críticas e sugestões.

Aos membros das bancas de acompanhamento e de defesa, por terem aceitado analisar e avaliar este trabalho. Minha grande admiração e sincera amizade.

A todos os indivíduos e instituições envolvidos neste estudo, sobretudo ao *Dr. Rubens S. Lima* e ao *Dr. Cícero Urban de Andrade*, cuja ajuda foi fundamental para realização deste trabalho. Ao Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital de Clínicas de Curitiba, Universidade Federal do Paraná e Universidade de Georgetown, aos seus professores e funcionários, que contribuíram com seu auxílio, conhecimento e infra-estrutura.

A todas as pacientes envolvidas neste estudo, pois sem elas este trabalho não seria possível.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética, pelo conhecimento transmitido e ajuda durante todas as etapas do Doutorado.

A todos os meus amigos do curso de Pós-Graduação em Genética e aos amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, por me acolherem, pelo carinho e grande amizade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

As minhas queridas amigas que conheci em Washington, DC, que me ajudaram a ser muito mais feliz, mesmo longe de casa. Pela amizade sincera, pra vida toda.

Em especial...

Aos meus pais, *Juarez e Tânia*, por serem minha referência de caráter, moral e determinação, e por me ajudarem a superar todas as dificuldades encontradas ao longo desse caminho.

A minha irmã *Isabela*, que sempre esteve ao meu lado, principalmente quando estive mais longe, me apoiando, encorajando e me fazendo rir. E também pela ajuda com os gráficos!

Ao *Marcelo*, meu marido, pela admiração incondicional e por me fazer acreditar na minha capacidade e ter orgulho de mim mesma. Pelo apoio durante esses quase 10 anos juntos. Pelo companheirismo e amor, mesmo à distância. E por me dar mais uma razão para vida: o Bernardo, que está a caminho. Eu te amo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada!

“A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria.”

Will Durant

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.Epidemiologia e etiologia dos carcinomas mamários.....	4
2.2.Linfonodos axilares mamários.....	9
2.2.1.Linfonodo Sentinela (LNS)	11
2.2.1.1.Métodos de Análise do Linfonodo Sentinela.....	14
2.3.Análise citogenética em tumores mamários metastáticos.....	16
2.3.1.Análises em amostras pareadas.....	20
3.JUSTIFICATIVA.....	25
4.OBJETIVOS.....	26
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1.Material.....	27
5.1.1Caracterização da amostra.....	27
5.2.Procedimentos técnicos.....	28
5.2.1.Microdissecção celular e Extração de DNA.....	28
5.2.2.Hibridização Genômica Comparativa (CGH).....	29
5.2.2.1.Obtenção das imagens.....	30
5.2.2.2.Análise das imagens.....	30
5.2.3.CGH- <i>array</i>	30
5.2.3.1.Obtenção e análise das imagens.....	31
5.2.4.Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	31
5.2.4.1.Análise e contagem dos sinais de hibridização.....	32
5.2.5.PCR em tempo real.....	32
5.2.5.1.Obtenção e análise dos dados.....	33
5.3.Análise estatística.....	33
6.RESULTADOS.....	34
6.1.CGH.....	34
6.2.CGH- <i>array</i>	58
6.2.1Validação dos resultados de CGH- <i>array</i> em genes específicos.....	79
6.2.1.1.FISH.....	79
6.2.1.2.PCR em tempo real.....	81
6.3.Correlação com genes envolvidos na tumorigênese mamária.....	87
6.4.Correlação com dados clínico-histopatológicos.....	89
7.DISSCUSSÃO.....	91
8.CONCLUSÃO.....	112
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de progressão tumoral linear.....	6
Figura 2 -	Perfil de CGH de um tumor primário.....	37
Figura 3 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em tumores primários.....	55
Figura 4 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em metástases nos linfonodos sentinela.....	56
Figura 5 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em todas os casos (TP + LNS).....	57
Figura 6 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em tumores primários.....	77
Figura 7 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em metástases nos linfonodos sentinela.....	78
Figura 8 -	Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em todas os casos (TP + LNS).....	78
Figura 9 -	Avaliação dos genes <i>BP1</i> e <i>HER2</i> por CGH-array (A) e FISH (B).....	86
Figura 10 -	Número de cópias do gene <i>BP1</i> observado por CGH-array e PCR em tempo real em dois casos.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição do número de ganhos por caso encontrados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	41
Gráfico 2 -	Distribuição do número de perdas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	41
Gráfico 3 -	Distribuição do número total de alterações cromossômicas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	42
Gráfico 4 -	Distribuição do número de ganhos por cromossomo encontrados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	45
Gráfico 5 -	Distribuição do número de perdas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	46
Gráfico 6 -	Distribuição do número total de alterações cromossômicas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	46
Gráfico 7 -	Diagrama de distribuição do número de ganhos e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.....	51
Gráfico 8 -	Diagrama de distribuição do número de perdas e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.....	51
Gráfico 9 -	Diagrama de distribuição do número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.....	52
Gráfico 10 -	Número de amplificações, observadas por CGH- <i>array</i> , por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	65
Gráfico 11 -	Número de deleções, observadas por CGH- <i>array</i> , por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	65
Gráfico 12 -	Número total de alterações cromossômicas, observadas por	

	CGH- <i>array</i> , por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	66
Gráfico 13 -	Número de ampliações, observadas por CGH- <i>array</i> , por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	69
Gráfico 14 -	Número de deleções, observadas por CGH- <i>array</i> , por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	70
Gráfico 15 -	Número total de alterações cromossômicas, observadas por CGH- <i>array</i> , por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.....	70
Gráfico 16 -	Diagrama de distribuição do número de ampliações e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.....	75
Gráfico 17 -	Diagrama de distribuição do número total de alterações cromossômicas (amplificações + deleções) e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.....	75
Gráfico 18 -	Comparação dos resultados de CGH- <i>array</i> e FISH para o gene <i>BP1</i>	79
Gráfico 19 -	Comparação dos resultados de CGH- <i>array</i> e FISH para o gene <i>HER2</i>	80
Gráfico 20 -	Análise de número de cópias do gene <i>AKT1</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	81
Gráfico 21 -	Análise de número de cópias do gene <i>AKT2</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	82
Gráfico 22 -	Análise de número de cópias do gene <i>BP1</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	82
Gráfico 23 -	Análise de número de cópias do gene <i>FGFR2</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	83
Gráfico 24 -	Análise de número de cópias do gene <i>HER2</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	83
Gráfico 25 -	Análise de número de cópias do gene <i>PIK3CA</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	84

Gráfico 26 -	Análise de número de cópias do gene <i>PTEN</i> nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	84
Gráfico 27 -	Principais funções gênicas observadas na análise dos genes presentes nas principais regiões cromossômicas alteradas observadas neste estudo.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados clínico-histopatológicos das pacientes	28
Tabela 2 -	Casos pareados e técnicas efetuadas.....	34
Tabela 3 -	Alterações cromossômicas observadas nos tumores primários.....	35
Tabela 4 -	Alterações cromossômicas observadas nas metástases dos linfonodos sentinela.....	36
Tabela 5 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas em tumores primários por caso.....	39
Tabela 6 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas em metástases dos linfonodos sentinela por caso.....	40
Tabela 7 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas em tumores primários por cromossomo.....	43
Tabela 8 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas em metástases dos linfonodos sentinela por cromossomo.....	44
Tabela 9 -	Médias de ganhos e perdas cromossômicas por caso e por cromossomo nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela, respectivamente.....	47
Tabela 10 -	Análise da variância das médias das aberrações cromossômicas observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.....	48
Tabela 11 -	Alterações compartilhadas entre os tumores primários e as metástases nos linfonodos sentinela.....	53
Tabela 12 -	Alterações cromossômicas observadas, por CGH-array, nos tumores primários.....	58
Tabela 13 -	Alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, nas metástases dos linfonodos sentinela.....	61
Tabela 14 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, por caso em tumores primários (A) e em metástases nos linfonodos sentinela (B).....	64
Tabela 15 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em tumores primários por cromossomo.....	67

Tabela 16 -	Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em metástases dos linfonodos sentinela por cromossomo.....	68
Tabela 17 -	Médias de ampliações (n= 76 e 73) e deleções (n=17 e 17) cromossômicas, observadas por CGH-array, por caso e por cromossomo nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela, respectivamente.....	71
Tabela 18 -	Alterações compartilhadas entre os tumores primários e as metástases nos linfonodos sentinela.....	76
Tabela 19 -	Regiões cromossômicas, observadas por CGH-array, mais comumente alteradas.....	77
Tabela 20 -	Número de cópias dos gene <i>BP1</i> e <i>HER2</i> observado pelas técnicas de CGH-array e PCR em tempo real.....	85
Tabela 21 -	Regiões mais comumente alteradas, observadas por CGH e CGH-array, e a presença dos respectivos genes e microRNAs alterados nestas regiões.....	87
Tabela 22 -	Dados clínico-histopatológicos das 30 pacientes analisadas por CGH.....	90

RESUMO

O câncer de mama é considerado uma das principais doenças potencialmente letais em mulheres. Atualmente, seu prognóstico é baseado em fatores histopatológicos e clínicos, sendo que a identificação de células tumorais nos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais eficaz. O linfonodo sentinela (LNS) é o primeiro da linhagem linfática a apresentar células malignas nos cânceres de mama que metastatizam. Sua positividade é um indicativo para o esvaziamento axilar completo. Apesar dos avanços na biópsia do LNS, ainda há um grande número de resultados falso-positivos e falso-negativos. Portanto, a avaliação precisa do LNS, capaz de identificar até o menor foco metastático, é essencial antes da realização do esvaziamento axilar. O objetivo principal deste estudo é identificar a presença de alterações de número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano em metástases nos LNS, em comparação com os tumores primários (TP) de mama correspondentes. Amostras pareadas de TP e LNS foram analisadas através dos métodos de CGH (30 pares) e CGH-array (10 pares). Para validação do CGH-array, foram realizados os métodos de FISH (genes *BP1* e *HER2*) e PCR em tempo real para número de cópias de DNA (genes *AKT1*, *AKT2*, *BP1*, *FGFR2*, *HER2*, *PIK3CA* e *PTEN*). Observamos, por CGH e CGH-array, mais ganhos do que perdas de material genético. Os principais ganhos, observados por CGH foram em 1p, 1q, 6p, 11p, 16, 17, 18q, 19, 20, 21 e 22. As perdas cromossômicas foram observadas principalmente em 1p, 2q, 4q, 6q, 12q, 13q, 18q e Xq. Por CGH-array, as alterações cromossômicas mais freqüentes, incluindo amplificações e deleções, ocorreram em 1q, 8q, 10q, 11q, 14q, 16p, 17q, 20q, 21q e Xq. A análise de FISH validou os resultados de CGH-array em 65% dos casos para o gene *BP1* e 55% dos casos para o gene *HER2*. A validação por PCR em tempo real foi mais concordante para os genes *BP1* (70,1%) e *HER2* (64,7%), seguida pelos genes *AKT2* (41,2%), *AKT1* e *FGFR2* (29,4% cada), *PIK3CA* (25,0%), e *PTEN* (11,8%). CGH e ou CGH-array são métodos muito sensíveis para a avaliação do número de cópias de DNA, podendo auxiliar na identificação de células tumorais no LNS. As alterações observadas, sendo validadas, poderão ser utilizadas como marcadores moleculares para a identificação de pacientes com câncer de mama com alto risco de desenvolvimento de metástases nos linfonodos axilares.

Palavras chave: câncer de mama, linfonodo sentinela, CGH, CGH-array, alterações de número de cópia de DNA.

ABSTRACT

Breast cancer is considered a major life-threatening disease in women. Currently, the prognosis is based on clinical and histopathological factors; the identification of tumor cells in axillary lymph nodes is the most effective prognostic factor. The sentinel lymph node (SLN) is the first node in the axilla to harbor malignant cells in breast tumors with metastasis, and its positivity is an indication for axillary lymph node dissection. Despite significant advances in the sentinel lymph node biopsy, there are still a significant number of false negatives results, especially in the case of micrometastasis. Therefore the accurate evaluation of the SLN, to identify even the smallest metastatic foci is essential prior to complete axillary lymph node dissection. In this study, we proposed to characterize the tumor cells present at the SLN using CGH (Comparative Genomic Hybridization) and array-CGH, global genomic approaches to identify DNA copy number changes. Paired cases of primary breast tumors (PBT) and SLN metastasis were analyzed using CGH (30 pairs) and array-CGH (10 pairs). Validation of array-CGH was performed by FISH (genes: *BP1* and *HER2*) and Taqman Copy Number Assay (genes *AKT1*, *AKT2*, *BP1*, *FGFR2*, *HER2*, *PIK3CA* and *PTEM*). CGH analysis revealed gains of chromosomal regions involving, most frequently, 1p, 1q, 6p, 11p, 16, 17, 18q, 19, 20, 21 and 22. Chromosomal losses were mainly observed in 1p, 2q, 4q, 6q, 12q, 13q, 18q and Xq. Array-CGH analysis detected both amplifications and deletions, affecting mostly the chromosome regions 1q, 8q, 10q, 11q, 14q, 16p, 17q, 20q, 21q and Xq regions. Array-CGH and FISH results were concordant for the *BP1* gene in 65% of cases and for *HER2* in 55%. Concordance between array-CGH results and by Taqman Copy Number Assay was higher for genes *BP1* (70,1%) and *HER2* (64,7%), followed by genes *AKT2* (41,2%), *AKT1* and *FGFR2* (29,4% each), *PIK3CA* (25,0%), and *PTEM* (11,8%). The assessment of copy number changes in the SLN metastasis using genomic profiling is a very sensitive method and can lead to the identification of genomic alterations that can reliably characterize breast tumor cells at the SLN lesions. Once these alterations are validated, they can be used as potential *molecular markers* to identify breast cancer patients at higher risk of developing axillary lymph node metastasis.

1. INTRODUÇÃO

Na última década uma série de importantes avanços ocorreu na clínica do câncer de mama, contribuindo para a sua detecção, diagnóstico e tratamento em estágios iniciais da doença. No entanto, o câncer de mama ainda é considerado uma das principais doenças potencialmente letais em mulheres (ABDUL-RASOOL et al., 2006). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram, para o ano de 2010, 489.270 novos casos de câncer, sendo que o de mama é o segundo mais incidente na população feminina, responsável por quase 50 mil novos casos (INCA/MS, 2011).

O câncer de mama apresenta alta heterogeneidade clínica e histopatológica, sendo difícil a determinação dos mecanismos envolvidos nos seus processos de desenvolvimento e progressão tumoral. Estudos moleculares têm sido extensivamente realizados nestes tumores, propiciando a identificação de alterações genômicas específicas e recorrentes. No entanto, o significado e a associação destas com os diferentes estágios da progressão tumoral ainda não são compreendidos (POLYAK, 2001).

Apesar de muitos estudos, não existem marcadores moleculares disponíveis para prever com eficácia o estadiamento dos cânceres de mama. Atualmente, o prognóstico da doença é baseado em parâmetros histológicos e clínicos, como a presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares, tipo e tamanho do tumor, presença ou ausência de receptores hormonais (para estrogênio e para progesterona) e do receptor do fator de crescimento epidermal (*ERBB2* ou *HER2/neu*). Destes, a determinação de células tumorais nos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais eficaz (LINDAHL et al., 2000), sendo que a presença destas confere um alto risco de recorrência da doença.

O linfonodo sentinela (LNS) é o primeiro linfonodo da cadeia linfática axilar a apresentar células malignas nos cânceres de mama que metastatizam. A biópsia do LNS é realizada para determinação do estadiamento do câncer de mama. A positividade deste linfonodo é considerada informativa sobre o estado dos demais linfonodos axilares quanto à presença de células tumorais e é utilizada como uma indicação para a dissecação axilar completa (VERONESI et al., 2001; GUENTHER et al., 2003; VERONESI et al., 2003). Entretanto, em alguns casos “LNS negativos”, pode ocorrer a presença de micrometástases (metástases de tamanho menor que

2mm) ou células tumorais isoladas (ITC), que não são detectadas pelos métodos tradicionais de análise patológica. Apesar da importância clínica da presença destas micrometástases ou ITC não ser completamente definida, estas podem conferir uma maior taxa (chance) de recidiva tumoral a estes pacientes (HERY et al., 2002; REED et al., 2004; SUSNIK et al., 2004; ZHU et al., 2006). Por outro lado, há ainda a presença de resultados falso-positivos na biópsia de LNS, onde o esvaziamento axilar é realizado desnecessariamente em pacientes com baixa probabilidade (chance) de recidiva.

Devido ao estabelecido valor preditivo da biópsia do LNS na prática clínica, é de fundamental importância a utilização de métodos sensíveis e precisos para a detecção das células tumorais mamárias neste linfonodo, para que possa-se prever com segurança quais os pacientes que apresentam risco aumentado de comprometimento de outros nódulos axilares e, conseqüentemente, alta taxa de recidiva.

Neste estudo, nosso objetivo foi caracterizar as células tumorais presentes no LNS quanto à presença de alterações de número de cópia de DNA (ou alterações cromossômicas). Amostras pareadas de tumor primário mamário e metástase no linfonodo sentinela do mesmo paciente foram analisadas utilizando os métodos de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e *CGH-array*, que permitem a localização de regiões cromossômicas alteradas em todo o genoma.

A análise de amostras pareadas do mesmo paciente possibilita a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo metastático, com importância fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativo de um provável comportamento clínico mais agressivo do tumor (KUUKASJARVI et al., 1997a). O grau de resolução das técnicas de CGH e de *CGH-array* fornece comparações detalhadas de alterações genéticas em amostras pareadas permitindo o estudo da progressão metastática e podendo auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem este processo (FOROZAN et al., 1997; KUUKASJARVI et al., 1997b; REIS-FILHO et al., 2005).

A caracterização das alterações cromossômicas no LNS resultará em um melhor entendimento da história natural e do comportamento biológico e clínico dos tumores malignos, sendo de importância para a aplicação de novos fatores preditivos e prognósticos no câncer de mama. No futuro, espera-se poder limitar a

técnica de biópsia do LNS e de métodos invasivos e de morbidade como o esvaziamento axilar, apenas à pacientes com alta probabilidade (chance) de recorrência tumoral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a teoria monoclonal do câncer (NOWEL, 1976), os tumores se originam de uma única célula que adquire diversas mutações e potencial proliferativo ilimitado. Apesar da iniciação e progressão tumoral ocorrerem devido a essas alterações genéticas, alterações epigenéticas e de microambiente também são de grande importância na tumorigênese (POLYAK, 2007).

As principais alterações genéticas observadas no câncer envolvem a expressão aumentada de proto-oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor, as instabilidades cromossômicas, as alterações nos genes de reparo do DNA, a reativação da telomerase e as alterações epigenéticas (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

2.1. Epidemiologia e etiologia dos carcinomas mamários

Nos últimos anos um grande número de pesquisas tem sido desenvolvida em câncer de mama objetivando um melhor prognóstico para esta doença, no entanto a taxa de mortalidade não tem sido alterada significativamente (BOYLE et al., 2003). O câncer de mama ainda é considerado uma das principais doenças potencialmente letais em mulheres, mesmo com os avanços no diagnóstico, estadiamento, e nos tratamentos quimio/radioterápicos e cirúrgicos (ABDUL-RASOOL et al., 2006).

De acordo com a revisão de POLYAK (2007), ainda existem diversos problemas clínicos e de pesquisa básica e aplicada em câncer de mama, principalmente relacionados a:

- Prevenção: quem precisa e quando;
- Diagnóstico: necessidade de métodos mais específicos e sensíveis;
- Progressão tumoral e recorrência: quais são as causas e como prevê-las;
- Tratamento: quem deve ser tratado e como; e
- Resistência à terapia: como prever, prevenir e superar.

A resolução de todos esses problemas torna-se mais complexa devido ao fato do câncer de mama não ser uma doença única e simples. Estudos baseados em expressão gênica têm confirmado a heterogeneidade dessa doença, tanto no nível molecular, quanto clínico (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001).

Para o ano de 2010 foram estimados 489.270 novos casos de câncer no Brasil, sendo que o de mama foi o segundo tipo mais incidente na população feminina, responsável por 49.240 novos casos. As estimativas para o ano de 2010 são de 2.990 casos novos para o Estado do Paraná e 730 para Curitiba (INCA/MS, 2011). Dados desse Instituto informam também que em 70% das mulheres o diagnóstico ocorre em estágio avançado, resultando, conseqüentemente, numa alta incidência de mortes.

As causas precisas do câncer de mama são ainda desconhecidas. Porém, existem alguns fatores de risco que podem conferir susceptibilidade, como: história familiar, exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade, exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (VAURY et al., 1995), ingestão de dieta rica em gorduras, consumo elevado de álcool (PARKIN et al., 2001) e presença de doença proliferativa benigna da mama (INCA/MS, 2011). Os fatores reprodutivos e hormonais aumentam o risco de câncer de mama em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média), nuliparidade e idade da primeira gestação acima de 30 anos. O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam controversos (PARKIN et al., 2001; COLLINS et al., 2005), não se conhecendo o seu papel real como fatores de risco.

O câncer de mama apresenta uma alta heterogeneidade clínica-histopatológica, o que dificulta a determinação dos mecanismos envolvidos nos processos de desenvolvimento e progressão destes tumores. De acordo com o modelo de progressão tumoral linear, sugere-se 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 (BECKMANN et al., 1997) (Figura 1). No entanto, nem todos os tumores seguem esta ordem de progressão, podendo inclusive não apresentar todos estes estágios (BALMAIN et al., 2003). Apesar de descritas alterações moleculares relacionadas ao câncer, o significado e a relação destas com os diferentes estágios da progressão tumoral ainda não são compreendidos (POLYAK, 2001).

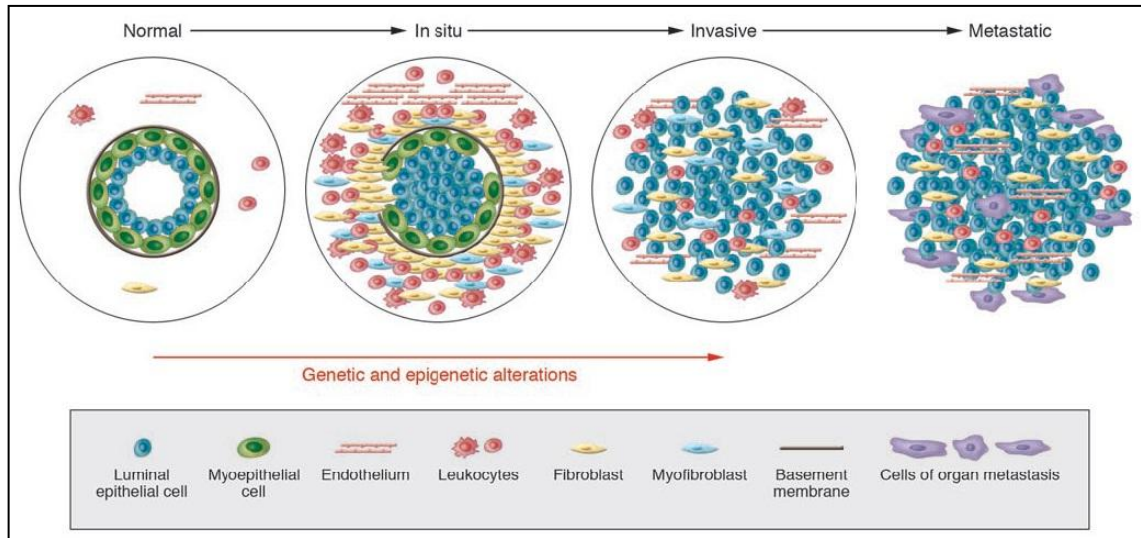


Figura 1: Modelo de progressão tumoral linear. Esquema da progressão da estrutura ducto-mamária normal, carcinoma *in situ*, invasivo e metastático. Os ductos mamários são formados pela membrana basal e uma bicamada de células luminais e mioepiteliais. O estroma é composto por leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. No carcinoma *in situ* as células mioepiteliais estão em menor número, devido à degradação da membrana basal, e o número de células luminais é maior. A perda de células mioepiteliais e da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, nos quais as células tumorais invadem os tecidos adjacentes e podem migrar para órgãos distantes, levando à formação de metástases.

Fonte: Polyak (2007).

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação são frequentemente utilizados na clínica e têm grande importância na orientação do tratamento. O Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos é o mais utilizado internacionalmente e se baseia na extensão anatômica da doença, que considera as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases a distancia (INCA/MS, 2011).

O grau de diferenciação histológica do tumor correlaciona as estruturas morfológicas dos tumores com seu grau de malignidade, avaliando a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica, sendo adotado oficialmente pela Organização Mundial de Saúde (SCARFF e TORLONI, 1968). O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando maior ou menor capacidade de metastatização. Os parâmetros de Scarff, Bloom e Richardson (SBR), utilizados para classificação histoprognotica, consideram que tumores de grau I (bem diferenciados) apresentam prognóstico favorável, de grau II (moderadamente diferenciados) apresentam prognóstico intermediário e de grau III (pouco diferenciados) apresentam pior prognóstico. Esses parâmetros foram inicialmente

desenvolvidos para os tumores ductais, mas atualmente, são aplicados a todos os tipos histológicos de carcinomas invasivos, exceto para os medulares e carcinomas *in situ* (Bloom e Richardson, 1957; Contesso, 1987, citados por RIETJENS e URBAN, 2007).

Além disso, atualmente, a classificação molecular introduzida com os estudos de expressão gênica (PEROU et al., 2000), tem sido utilizada para estabelecer subtipos moleculares, que diferem quanto à origem e ao perfil de expressão, estando associados a prognósticos e respostas clínicas diferentes (AHR et al., 2001; BERTUCCI et al., 2002; HU et al., 2009).

Uma série de marcadores moleculares com potencial prognóstico e terapêutico foi identificada em câncer de mama. Dentre estes, os que se encontram incorporados na prática clínica são: os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e o oncogene *HER2* (fator de crescimento epidermal também conhecido como *ERBB2*), que codifica a proteína HER2. Estes marcadores são rotineiramente testados em relação à sua expressão protéica, devido ao fato de apresentarem implicações terapêuticas diretas. A amplificação e expressão protéica aumentada do gene *HER2* ocorre em cerca de 30% dos cânceres de mama invasivos (SLAMON et al., 1987; SESHADRI et al., 1993) e nestes pacientes o tratamento indicado é o Trastuzumab (nome comercial – Herceptina - Roche), um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente a proteína codificada pelo gene *HER2* (TUBBS et al., 2001). Por outro lado, estima-se que 70% a 80% das pacientes que apresentam receptores hormonais (ER e PR) positivos responderão ao tratamento com terapia hormonal, enquanto que somente 5% das pacientes onde os tumores não possuem nenhuma receptividade hormonal apresentarão esta resposta (Fisher et al., 2005, citado por RIETJENS e URBAN, 2007). Esse tratamento pode ser realizado com moduladores do receptor de estrogênio, como o Tamoxifeno, ou inibidores de aromatase (BUSH, 2007). Já pacientes com tumores classificados como triplo-negativos (negativo para a expressão do *HER2* e para os receptores hormonais) não respondem a estas terapias específicas. Esses tumores normalmente apresentam um comportamento clínico agressivo, com rápida progressão tumoral e, conseqüentemente, conferem um prognóstico desfavorável a curto prazo (CLEATOR et al., 2007).

Devido a, geralmente, responderem de forma diversa às terapias existentes, a melhor definição desses subtipos e o aumento de conhecimento em relação a suas

diferenças biológicas são essenciais para melhorar a eficiência do tratamento do câncer. Por meio de pesquisas utilizando métodos de *microarrays* (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; 2003), que permitem um agrupamento hierárquico a partir de dados de expressão gênica organizando os tumores em subgrupos, passou-se a uma melhor compreensão destes subtipos e de sua aplicação clínica.

Alguns subtipos tumorais mamários apresentam alterações genéticas e perfis de expressão gênica específicos (WANG et al., 2004), em relação a resposta à quimioterapia (TROESTER et al., 2004), sugerindo representarem doenças distintas (BERTUCCI et al., 2005). Os subtipos são os mesmos nos diferentes grupos étnicos, evidenciando a importância dessa classificação para o prognóstico e o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama (YU et al., 2004).

Inicialmente, quatro subgrupos moleculares principais de câncer de mama foram definidos por perfis de expressão gênica: grupo HER2+, grupo luminal (predominantemente tumores ER+ e PR+), grupo tipo basal (*basal-like*, predominantemente triplo-negativos) e tipo normal (*normal breast-like*) (PEROU et al., 2000). Os tumores de mama do grupo basal, que em geral apresentam pior prognóstico, expressam genes como os que são tipicamente expressos em células mioepiteliais normais (citoqueratinas 5, 6 e 17). Já os tumores luminais expressam preferencialmente genes de células epiteliais, como o gene da E-caderina e das citoqueratinas 8 e 18 (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2000; TURNER e REIS-FILHO, 2006).

Estudos subseqüentes, realizando um agrupamento com uma maior resolução, permitiram a diferenciação do grupo luminal em dois subtipos com características biológicas distintas, denominados luminal A e B. Tumores classificados como luminal A apresentam o melhor prognóstico entre todos os subtipos de câncer de mama, enquanto os tumores luminal B, que apresentam um menor nível de transcritos do receptor de estrogênio, tem um prognóstico menos favorável (SORLIE et al., 2001; KAPP et al., 2006).

Entretanto, apesar do avanço das técnicas e análises de *microarrays* (DRIOUCH et al., 2007; LU et al., 2008), ainda existe uma série de problemas metodológicos e de reprodutibilidade que devem ser resolvidos, antes que os resultados destas pesquisas sejam utilizados na prática clínica (VIRTANEN et al., 2008).

Os mecanismos moleculares relacionados à progressão do câncer de mama ainda não estão completamente caracterizados. O câncer de mama pode evoluir para metástases nos linfonodos regionais, em órgãos distantes (como pulmões, fígado e cérebro), ou para ambos os sítios – regional e distante. Metástases em órgãos distantes são as principais responsáveis pela mortalidade e, em conjunto com a resposta à terapia, determinam a evolução clínica na maioria das mulheres com essa doença. Os fatores que determinam o potencial metastático de um tumor, tanto para os linfonodos como para sítios mais distantes, não são completamente conhecidos. Uma das hipóteses em relação ao processo de metastatização mamária postula que a metástase seja resultado de eventos moleculares selecionados em clones raros de células provenientes do tumor primário. De acordo com essa hipótese, se esses clones capazes de metastatizar representam uma pequena fração do tumor primário, então a predição de metástases não é eficiente por meio da análise total do tumor primário. Outra hipótese admite que a capacidade metastática é determinada pela soma de alterações moleculares que caracterizam a maioria das células presentes no tumor primário. Nesse caso, a metástase pode ser prevista e biomarcadores de uso clínico podem ser identificados. Por serem contrastantes, essas hipóteses continuam sendo alvo de muita pesquisa.

Deste modo, até o momento, não existem marcadores moleculares disponíveis clinicamente para avaliar com eficácia o estadiamento dos cânceres de mama. Atualmente, como já referido, o prognóstico da doença é baseado em parâmetros histológicos e clínicos, como a presença ou ausência de linfonodos axilares metastáticos, tipo e tamanho do tumor, presença ou ausência de receptores hormonais (ER e PR) e amplificação e expressão aumentada do gene *HER2*.

2.2. Linfonodos axilares mamários

A análise dos linfonodos axilares é o principal fator prognóstico do câncer de mama e um dos procedimentos mais relevantes para o estadiamento tumoral, considerando que a presença de metástases nos mesmos confere um alto risco de recorrência (LINDAHL et al., 2000; REINTGEN et al., 2000). De acordo com ERVEN et al. (2007), 50% das pacientes com envolvimento de linfonodos ao diagnóstico desenvolverão metástases em sítios distantes em um período de 5 anos.

Diversos estudos correlacionaram parâmetros clínico-histopatológicos de pacientes com câncer de mama com o risco potencial de desenvolver metástases nos linfonodos axilares. Entre os parâmetros mais significativos estão a idade da paciente, o tamanho e o grau tumoral (BOLLET et al., 2007; HAYES, 2005; FINEK et al., 2007). Além disso, tumores que apresentam componentes micropapilares e invasão linfática e capilar têm sido associados com um risco aumentado de desenvolvimento de metástases linfonodais (PETTINATO et al., 2004; COLLEONI et al., 2007; MARINHO et al., 2008). Apesar de diversos desses parâmetros serem considerados bons indicadores da presença de metástases, eles não permitem a classificação dos tumores mamários de acordo com seu comportamento clínico e não predizem seguramente a recorrência da doença (CAVALLI, 2009).

A dissecação axilar completa, ou esvaziamento axilar completo, determina um prognóstico eficaz e é um método confiável de controle de recorrência, tanto em pacientes linfonodo positivos como em negativos (Recht et al., 1991; Azelsson et al., 1992; citados por SAKORAFAS et al., 2000; WRIGHT et al., 2003). Através deste procedimento é determinada a escolha do tratamento específico para cada paciente (SAKORAFAS et al., 2000), o que resulta em uma melhora potencial do tempo de sobrevivência (ORR, 1999). Entretanto, este procedimento também está associado com uma alta morbidade comumente com a redução da mobilidade do braço, causando comumente: infecção local, dor na região, seroma e linfedema (REINTGEN et al., 2000, SAKORAFAS et al., 2000; REITSAMER et al., 2003). Além disso, mais da metade das pacientes submetidas à dissecação axilar completa apresentam linfonodos livres de metástases, sendo, portanto, submetidas a complicações e riscos cirúrgicos, desnecessariamente (GIULIANO et al., 1997).

Sendo assim, o desenvolvimento de métodos que possibilitem o estadiamento do câncer de mama, através de procedimentos pouco ou não-invasivos, é necessário e pode evitar o procedimento de esvaziamento axilar, diminuindo a morbidade e aumentando a qualidade de vida da paciente. A biópsia do linfonodo sentinela vem sendo utilizada neste sentido (GIULIANO et al., 1996; VERONESI et al., 1999, 2001).

2.2.1. Linfonodo sentinela (LNS)

O linfonodo sentinela (LNS) é o primeiro linfonodo da cadeia linfática axilar e, portanto, o primeiro a apresentar células malignas nos cânceres de mama que metastatizam. A positividade deste linfonodo é informativa sobre o estado dos demais linfonodos axilares (GUENTHER et al., 2003; VERONESI et al., 2003) e é utilizada como uma indicação para dissecação axilar completa (GIULIANO, 1996; BRESLIN et al., 2000; VERONESI et al., 2001). O LNS pode ser identificado no momento da cirurgia pela injeção de um corante vital no tumor primário. Esse linfonodo é então dissecado e analisado por um patologista, através de análise pela coloração do material com hematoxilina-eosina (H&E) e de métodos de imunohistoquímica. Se esta análise revelar a ausência de células mamárias tumorais, pode-se admitir que não existam metástases nos demais linfonodos axilares, indicando que o tumor mamário está possivelmente limitado ao seu sítio primário. Por outro lado, a presença de metástases no LNS sugere o comprometimento dos outros linfonodos axilares e, portanto, é indicado o procedimento de dissecação axilar completa.

No primeiro estudo sobre LNS publicado em câncer de mama, os mesmos foram identificados em 65,5% dos procedimentos cirúrgicos realizados (GIULIANO et al., 1994). Atualmente, através da utilização de corante vital, os linfonodos podem ser classificados em positivos ou negativos em 95,6% dos casos, demonstrando que a aplicação deste método poderia evitar as dissecações axilares completas desnecessárias, considerando que na maioria dos casos estes resultados iniciais coincidiram com os obtidos através da análise dos submetidos à dissecação axilar completa. A partir deste dado, a análise do LNS tem possibilitado o estadiamento anatomopatológico mais preciso do câncer de mama (GIULIANO et al., 1995; ROSSER et al., 2000; RAMPAL et al., 2001). A baixa incidência de resultados falso-negativos (amostras negativas para o LNS, mas com presença de células tumorais na forma de micrometástases ou ICT) possibilitou que este procedimento fosse validado, permitindo a sua introdução na prática clínica desde 1994 (GIULIANO et al., 1994, 1997; VERONESI et al., 2003; VIALE et al., 2005; MABRI e GIULIANO, 2007). Atualmente, existem métodos mais eficazes para a detecção de células tumorais no LNS (como será analisado no item seguinte), o que vem

permitindo a redução ainda maior da freqüência de resultados falso-negativos, e reforçando a capacidade de predição de metástases axilares pela análise do LNS.

A análise do LNS apresenta vantagens em relação a procedimentos que resultam no esvaziamento axilar completo, como uma evidente redução na morbidade das pacientes (GIULIANO e KELEMEN, 1998, 2000; SCHRENCK et al., 2000; GOLSHAN et al., 2003; PEINTINGER et al., 2003; KIM et al., 2005; LUCCI et al., 2007), uma maior eficiência na detecção de metástases (GIULIANO et al., 1995; WIDT-LEVERT et al., 2003; LEIDENIUS et al., 2004; WEIGELT et al., 2004), e a obtenção de informações adicionais sobre metástases nos nódulos mamários internos (ESTOURGIE et al., 2004).

De acordo com vários estudos, as taxas de recidiva observadas em pacientes com análises de LNS negativas, variam de 0% a 1,4%, indicando que estas fornecem uma informação segura, podendo substituir a dissecação total dos linfonodos axilares (GIULIANO et al., 2000; ROUMEN et al., 2001; CHUNG et al., 2002; VERONESI et al., 2003; NAIK et al., 2004; KOKKE et al., 2005; SMIDT et al., 2005; TAKEI et al., 2007).

Apesar de todos os avanços na técnica do LNS, uma das principais dificuldades permanece a identificação de micrometástases, que são definidas como focos metastáticos menores que 2mm de diâmetro (HUVOS et al., 1971; REED et al., 2004; SUSNIK et al., 2004). A presença de metástases ocultas, micrometástases ou células tumorais latentes, muitas vezes indetectáveis pelos métodos tradicionais de análise do LNS, está associada, de acordo com alguns autores, com uma taxa de recidiva, em pacientes linfonodo negativas, de cerca de 25% entre 5 a 10 anos após o diagnóstico (HERY et al., 2002; REED et al., 2004; SUSNIK et al., 2004; ZHU et al., 2006). Nesse caso, para diminuir a taxa de resultados falso-negativos, novos protocolos vêm sendo testados e sugere-se a utilização conjunta de mais de um método de análise. Algumas pesquisas também indicam que pacientes com micrometástase no LNS têm uma maior probabilidade de ter macrometástase nos outros linfonodos, entretanto isso indicaria apenas uma pequena probabilidade de se mudar o *status* do LNS de negativo para positivo (DABBS et al., 2004; GIPPOONI et al., 2006; CHRISTIANSEN et al., 2008). Outros estudos sugerem que a presença de micrometástase no LNS, ou em outro linfonodo, não parece mudar o prognóstico (CHEN et al., 2007; GRABAU, 2008; RUTGERS, 2008). De qualquer maneira, por ainda ser muito controverso o fato de submeter uma paciente ao esvaziamento axilar

intra-operatório devido à presença de uma micrometástase, essa decisão deve ser baseada nas características clínicas e histopatológicas do tumor primário (SAHIN et al., 2008). Essa controvérsia é, em parte, causada pela falta de uniformidade na avaliação do LNS, se tornando difícil a comparação de resultados obtidos pelo emprego de metodologias diferentes. Em relação ao tratamento, deve-se oferecer às pacientes com micrometástases as mesmas opções de pacientes com macrometástases (MONTAGNA et al., 2009).

Possíveis contra-indicações para a biópsia do LNS, incluindo tumores com tamanho grande e multicêntricos, já foram desconsideradas. Entretanto, esse procedimento em pacientes que recebem quimioterapia neo-adjuvante e em pacientes que têm recorrência da doença após terem realizado a biópsia do LNS e preservado a mama ainda é controverso. A relevância clínica da presença de micrometástases e células tumorais isoladas continua indefinida, sendo necessários estudos adicionais para definir se o esvaziamento axilar completo deve ser realizado quando o LNS é positivo (GOYAL e MANSEL, 2008).

De qualquer forma, a biópsia do LNS é um procedimento essencial para o estadiamento do câncer de mama, sendo que a presença de metástases mamárias no LNS apresenta grande importância na decisão da escolha de terapias sistêmicas e do monitoramento da cirurgia regional. A ausência de células malignas neste linfonodo pode evitar intervenções cirúrgicas desnecessárias, a toxicidade da radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, reduzindo substancialmente, portanto, encargos da saúde pública (ADBUL-RASOOL et al., 2006) e aumentando a qualidade de vida das pacientes.

Estudos recentes reafirmam a importância da biópsia do LNS em pacientes com câncer de mama. WERNICKE et al. (2011) realizaram um seguimento de 10 anos para comparar a sobrevida de pacientes de dois grupos distintos: o primeiro com tumores de mama em estágio inicial, linfonodo sentinela negativo, tratados com radioterapia na mama e que não foram submetidos ao esvaziamento axilar completo. O segundo composto por pacientes nas mesmas condições, porém submetidos ao esvaziamento. A taxa de sobrevida dos dois grupos estudados foi similar, mostrando a equivalência da realização apenas da biópsia com a do esvaziamento, reforçando que um resultado negativo na biópsia do LNS pode evitar a morbidade associada ao esvaziamento axilar completo.

Numa análise clínica, GIULIANO et al. (2011) compararam pacientes com LNS positivo que se submeteram ao esvaziamento axilar com pacientes LNS positivo que não o fizeram, com o objetivo de avaliar os efeitos do esvaziamento axilar na sobrevida desses pacientes. Os autores concluíram que apenas o tratamento sistêmico, com conservação da mama e dos linfonodos axilares, não resultou em uma menor taxa de sobrevida, mostrando que o esvaziamento axilar completo não causou benefícios para as pacientes que o fizeram.

O reconhecimento da complexidade dos tumores vem mudando o tratamento do câncer de mama, sendo que este está sendo decidido por uma série de fatores relacionados ao paciente e ao tumor especificamente. A realização do esvaziamento axilar completo vem diminuindo nos últimos anos, mesmo em casos de pacientes com linfonodos positivos (RESCIGNO et al., 2009).

2.2.1.1. Métodos de análise do Linfonodo Sentinela

A metodologia padrão utilizada para a identificação de metástases no LNS é a análise patológica de material corado com hematoxilina-eosina (H&E). Esta metodologia, realizada muitas vezes no momento da cirurgia, avalia apenas uma ou duas seções do linfonodo, o que representa menos de 1% do mesmo, podendo determinar uma alta porcentagem de resultados falsos negativos (LIBERMAN et al., 2000). Alguns centros de patologia analisam seções seriadas deste linfonodo, o que aumenta significativamente a possibilidade de detecção de células tumorais, no entanto este procedimento, por questões econômicas, não é possível de ser realizado em todos os centros clínicos. Outro método utilizado para aumentar a detecção de micrometástases no LNS, é a imunohistoquímica (IHC), que utiliza anticorpos contra antígenos epiteliais (citoqueratinas) ou antígenos associados a tumores (NAHRIG et al., 2000). Segundo DOWLATSHAHI et al. (1997) e WEAVER et al. (2000), este método tem a capacidade de detectar micrometástases em 10-20% de pacientes com câncer de mama e linfonodo sentinela negativo.

A utilização destas duas metodologias em conjunto tem propiciado a identificação mais precisa de células tumorais nos linfonodos, reduzindo os resultados falso-negativos, embora apresentem inconveniências para a prática

clínica não só devido ao tempo para obtenção dos resultados como pela variabilidade metodológica utilizada em diferentes centros de pesquisa.

A introdução de testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) também vem auxiliando numa detecção mais sensível de metástases nos linfonodos axilares. A RT-PCR (reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa) é um método muito sensível em que as células malignas são detectadas através da amplificação de mRNA tecido-específicos (NEUMAIER et al., 1995). Baseia-se no fato de que as células tumorais geralmente continuam a expressar marcadores que são característicos ou específicos do tecido normal da qual se originaram. Assim, a expressão desses mRNAs tecido-específicos em um local onde esses transcritos não estão normalmente presentes, como nos linfonodos, indica que o tumor se propagou. Este método tem sido utilizado principalmente em tumores sólidos e também para a detecção de células tumorais circulantes e micrometástases na medula óssea (TIMAR et al., 2002). No câncer de mama, muitos estudos utilizaram a RT-PCR para a detecção de metástases em LNS e em outros linfonodos, através de diferentes marcadores de mRNA. Alguns deles apresentaram falta de sensibilidade, sendo detectados na mesma frequência em LNS histologicamente positivos e negativos (BOSTICK et al., 1998; MIN et al., 1998; AIHARA et al., 1999; MANZOTTI et al., 2001). Outros marcadores apresentaram uma sensibilidade e especificidade maior, mas ao serem utilizados em painéis (em conjunto), para aumentar a probabilidade de detecção de populações celulares tumorais específicas (BOSTICK et al., 1998; MIN et al., 1998), tiveram sua especificidade substancialmente reduzida (MANZOTTI et al., 2001). Além disso, vários dos marcadores de mRNA disponíveis são encontrados também nos tecidos linfóide e hematológico dos linfonodos (KRAG e WEAVER, 2002).

Entretanto, muitos estudos têm identificado diversos marcadores moleculares com um significativo potencial prognóstico para o câncer de mama em relação ao risco de metástases axilares e sistêmicas, como: **HER2**, TP53, MMP, MAM, VEGF, COX2, NM23, entre outros (CAVALLI, 2009). NATHANSON et al. (2006) observaram que a amplificação do *HER2* e a expressão aumentada do mRNA correspondente são capazes de predizer metástases no LNS. BLUMENCRANZ et al. (2007) realizaram um estudo clínico para detectar durante o procedimento cirúrgico a presença de células tumorais no LNS através da análise dos marcadores da mamaglobina (*hMAM*) e da citoqueratina-19 (*CK19*) por PCR em tempo real.

Estudos de validação utilizando esse método também demonstraram uma melhor sensibilidade e especificidade quando comparado às técnicas comumente utilizadas na análise do LNS (JULIAN et al., 2008; VIALE et al., 2008; MANSEL et al., 2009).

Estes métodos apresentam uma alta sensibilidade e baixa especificidade, principalmente a RT-PCR utilizando os marcadores de mRNA atualmente disponíveis para a identificação de células malignas. Apesar de contribuírem para a detecção de células tumorais mamárias no LNS, geram uma grande frequência de resultados falso-positivos, o que dificulta a utilização dos mesmos isoladamente na prática clínica e, também, não permite a detecção de micrometástases ou células tumorais isoladas.

Os métodos para detecção de metástases no LNS continuam sendo alvo de muita controvérsia, pois, apesar dos mesmos possibilitarem uma avaliação mais detalhada sobre as metástases, para se obter resultados mais precisos seria necessário analisar um maior número de espécimes (TURNER et al., 1999; DOWLATSHAHI et al., 2001; VERONESI et al., 2001; MOTOMURA et al., 2002; FORTUNATO et al., 2007). Esta análise envolveria uma maior agilidade quantitativa e qualitativa no preparo e análise do material que nem sempre é viável, considerando que o mesmo deve ser efetivado durante o procedimento cirúrgico.

Neste sentido, os métodos baseados nos *microarrays* são de grande utilidade, pois detectam alterações ao nível gênico ou de expressão, em todo o genoma tumoral e em um único experimento. A identificação dessas alterações no LNS, primeiro local de metastatização axilar mamária, é de grande relevância por prever o comprometimento de metástases em outros sítios. No futuro, espera-se detectar essas alterações responsáveis pelo comportamento metastático na análise do tumor primário ao diagnóstico, podendo-se assim prever quais pacientes apresentam um alto risco de desenvolver metástases axilares linfonodais, sem a necessidade de se realizar a biópsia do SLN e/ou o esvaziamento axilar.

2.3. Análise citogenética em tumores mamários metastáticos

Métodos de citogenética convencional (bandeamento G) (SCHERES, 1972) e molecular (baseados em FISH – hibridização *in situ* por fluorescência) têm sido utilizados para o estudo de alterações genéticas em lesões metastáticas mamárias.

A citogenética convencional fornece informações de todo complemento cromossômico em uma análise celular individual, identificando alterações genômicas balanceadas e não-balanceadas. Os primeiros estudos citogenéticos em linfonodos axilares, utilizaram o bandeamento G, e demonstraram uma associação entre alterações cromossômicas e parâmetros histopatológicos do câncer de mama. Nestes, a análise de tumores primários de pacientes com metástases nos linfonodos axilares mostrou principalmente perdas nos cromossomos 17, 19, 21, 22 e X e ganhos nos cromossomos 9 e 18 (CAVALLI, 2006).

O método de FISH (CREMER et al., 1986) permite a localização de seqüências específicas de ácidos nucléicos e foi desenvolvido para substituir métodos que utilizavam elementos radioativos (PARDUE e GALL, 1970). Possibilita o mapeamento físico dos genes nos cromossomos, no qual sondas marcadas com fluorocromos hibridizam em regiões homólogas específicas e podem ser visualizadas e identificadas em um microscópio de fluorescência. O método permite a identificação e quantificação com rapidez e precisão de cromossomos ou genes específicos, podendo ser aplicado para a detecção de aneuploidias, euploidias, rearranjos cromossômicos (translocações, inversões), deleções e duplicações (LEVSKY e SINGER, 2003). Uma grande vantagem deste método no estudo de cânceres está na possibilidade de se realizar a análise em núcleos interfásicos e em material tumoral parafinizado, o que permite a avaliação genotípica e fenotípica da mesma célula simultaneamente. Não há, portanto, a necessidade de cultivo celular e obtenção de cromossomos, o que é particularmente útil para tumores que apresentam baixo índice mitótico. No câncer de mama, o FISH tem sido usado na avaliação de alvos moleculares, como genes marcadores. Um exemplo é a verificação da amplificação do gene *HER2* em adenocarcinomas de mama, utilizando sondas específicas para este gene, que é um método efetivo como um marcador prognóstico e um determinante para a administração de terapia baseada no anticorpo monoclonal Trastuzumab. Pacientes com amplificação de HER2/NEU apresentam resposta favorável a esta terapia.

A Hibridização Genômica Comparativa (CGH - *Comparative Genomic Hybridization*) é um método de citogenética molecular utilizado para analisar todo o genoma, identificando alterações no número de cópias do DNA (KALLIONIEMI et al., 1994), devidas à instabilidade genômica das células cancerosas (DAVIES et al., 2005). O método permite um *screening* inicial de alterações do número de cópias de

DNA sem a necessidade de preparação de metáfases. Consiste na hibridização simultânea de DNA tumoral (DNA teste) e de um indivíduo normal (DNA de referência) marcados com fluorocromos diferentes nos cromossomos humanos, que servem como substrato sólido para a hibridização (KALLIONIEMI et al, 1992). Neste método a única amostra necessária do paciente é o DNA tumoral, o qual pode ser obtido de amostras tumorais a fresco, congeladas ou até mesmo armazenadas em parafina.

A metodologia de CGH tem a capacidade de identificar ampliações gênicas maiores que 2Mb e deleções maiores que 10Mb, as quais podem ser detectadas e mapeadas diretamente nos cromossomos humanos normais (KALLIONIEMI et al., 1994). A sensibilidade deste método é diretamente relacionada à pureza da população celular tumoral utilizada no estudo. É comum, desta forma, o emprego anterior ao método de CGH de técnicas de microdissecção celular, como por exemplo, a *Laser Capture Microdissection* (LCM), para evitar a contaminação da amostra tumoral com células normais provenientes do estroma, ou de tecidos normais que circundam o tumor. A CGH, no entanto, apresenta limitações: não detecta alterações que não envolvam perda ou ganho de material genético, não se observando, portanto, alterações cromossômicas balanceadas, como por exemplo, translocações, inversões, etc.; e também alterações que ocorram em baixa frequência, detectando apenas o clone predominante, ou seja, alterações que estão presentes em uma grande porcentagem das células tumorais (KALLIONIEMI et al., 1994; WEISS et al., 1999). ISOLA et al. (1995) foram os primeiros a descrever que alterações genéticas detectadas por CGH poderiam prever a recorrência de câncer de mama em pacientes linfonodos-negativas, ou seja, sem metástases nos linfonodos. Nesse estudo, pacientes que apresentavam um maior número de alterações genéticas sofreram recorrência da doença, enquanto pacientes com poucas alterações permaneceram “livres” da doença. Outros estudos confirmaram essas observações iniciais, sendo que pacientes linfonodo-negativas com um maior número de alterações do número de cópia de DNA apresentaram maior recorrência da doença (AUBELE et al., 2002; CLIMENT et al., 2002; DELLAS et al., 2002; KARLSSON et al., 2007).

Um método mais recente, CGH-array, tem sido amplamente utilizado em vários estudos em cânceres humanos para a detecção das alterações do número de cópias de DNA com uma maior capacidade de resolução (100-200kb) que o CGH

convencional. Através deste método, ocorre a caracterização de alterações moleculares ao nível gênico, através de um “mapeamento” de alta resolução, que utiliza um *array* como suporte sólido para a hibridização, de ganhos e perdas em locos específicos no genoma (PINKEL et al., 1998). A metodologia do CGH-*array* segue o princípio do método convencional de CGH, onde DNA normal e tumoral são hibridizados simultaneamente em quantidades iguais. No entanto, ao invés de serem hibridizados em preparações metafásicas normais, a hibridização ocorre em *arrays*, o que propicia um maior poder de resolução, permitindo a detecção de células com alterações de até uma cópia do DNA. As primeiras plataformas de *arrays* desenvolvidas eram provenientes de clones genômicos grandes inseridos em vetores tipo BACs, YACs ou PACs; clones mais curtos, como em cosmídeos e cDNA foram introduzidos posteriormente (POLLACK et al., 1999). Recentemente, foram desenvolvidas plataformas contendo oligonucleotídeos, que normalmente apresentam um tamanho de apenas 60 monômeros, que oferecem uma maior resolução (YLSTRA et al., 2006). É importante ressaltar, no entanto, que assim como o CGH convencional, o CGH-*array* não permite a identificação de alterações cromossômicas balanceadas, onde não há alteração do número de cópias de DNA, permanecendo os métodos de citogenética clássica ou FISH e SKY como os mais apropriados para a detecção destes tipos de rearranjos (CAVALLI et al., 2003).

Tanto o CGH, como o CGH-*array*, tem auxiliado na identificação de genes importantes nos diferentes subtipos de câncer de mama, em cânceres esporádicos e hereditários e também para um melhor conhecimento dos mecanismos de progressão do câncer e do processo metastático (REIS-FILHO et al., 2005; VAN BEERS e NEDERLOF, 2006; CLIMENT et al., 2007).

Utilizando CGH-*array*, HAN et al. (2006) analisaram tumores ER+ de pacientes tratadas com tamoxifeno por pelo menos 1 ano e observaram que alterações nos cromossomos 1p36.33, 11p11.2, 11p15 e 11q13.1 eram encontradas nas pacientes que apresentavam recorrência da doença. Em outra análise, considerando o envolvimento de linfonodos, foi observado que perdas em 1p36 e 11p15 eram mais freqüentes em pacientes com recorrência da doença e linfonodo-positivas. Outros estudos têm identificado alterações de número de cópias de DNA recorrentes em tumores de mama primários (VAN BEERS e NEDERLOF, 2006; HAVERTY et al., 2008), tais como ganhos em 8q11, 1q21, 17q11, 20q e 11q13, e perdas em 5q, 6q e 8p. Tumores ER- apresentam maior freqüência de perdas em 5q

e ganhos em 6q do que tumores ER+. Geralmente, entre os segmentos genômicos que estão freqüentemente deletados, incluem-se regiões que contém genes supressores tumorais como o *CDKN2A* e *PTEN*. Nas regiões amplificadas, objetiva-se identificar “*driver genes*”, que são os genes que, quando amplificados, dão uma vantagem seletiva de crescimento para as células cancerosas.

A introdução destes métodos de maior poder de resolução tem permitido um grande avanço no conhecimento das alterações de número de cópias de DNA que estão presentes nos tumores humanos, incluindo o de mama. Os padrões de alterações de número de cópias de DNA podem definir os diferentes tipos de câncer de mama e alterações freqüentes em locais específicos nos cromossomos podem indicar a presença de genes que são funcionalmente importantes na carcinogênese. A identificação desses genes pode permitir a caracterização de novas vias oncogênicas e levar ao descobrimento de novos alvos terapêuticos. As alterações de número de cópias de DNA também podem ser utilizadas como biomarcadores de prognóstico e resposta a terapia.

2.3.1. Análises em amostras pareadas

Uma série de estudos, utilizando os métodos acima citados, tem sido realizada em amostras pareadas de carcinomas primários e metastáticos de mama (PANDIS et al., 1994, 1998; TEIXEIRA et al., 1996, 2002; BERNARDINO et al., 1997; KUUKASJARVI et al., 1997a, b; NISHIZAKI et al., 1997; CAVALLI et al., 2003; SANTOS et al., 2008). Estes estudos objetivam a análise de similaridades e diferenças entre as alterações presentes no tumor primário e nas lesões metastáticas, na tentativa de definir se existem alguns tipos de alterações nos tumores primários que indiquem que as metástases têm uma maior probabilidade de ocorrerem. A análise genética de amostras pareadas também permite verificar o grau de divergência clonal e de heterogeneidade genética que caracterizam o processo metastático, o que é importante para o entendimento da biologia das metástases e para prever o comportamento clínico (KUUKASJARVI et al., 1997a). As análises iniciais nessas amostras pareadas, utilizando a citogenética clássica, mostraram em geral, que as lesões metastáticas apresentam alterações cromossômicas mais complexas do que as dos tumores primários. Além disso, determinadas aberrações cromossômicas eram mais freqüentes nas metástases,

enquanto outras ocorriam em ambos os grupos, sugerindo que pudessem existir eventos especificamente associados ao processo de disseminação (PANDIS et al., 1994, 1998; TEIXEIRA et al., 1996).

TEIXEIRA et al. (1996) analisaram, por bandeamento G, 17 carcinomas mamários e suas correspondentes lesões metastáticas. Alterações cromossômicas foram descritas em ambos os grupos incluindo: deleções nos cromossomos 1, 3, 6 e 7, translocação entre os cromossomos 1 e 16, monossomias dos cromossomos X, 18 e 19 e trissomias dos cromossomos 3, 7, 12, 18 e 20. Os autores observaram que os tumores metastáticos apresentaram um menor número de clones anormais, embora fossem cariotipicamente mais complexos do que os primários, o que concorda com os dados descritos por PANDIS et al. (1994) e ADEYINKA et al. (2000). Segundo TEIXEIRA et al. (2002), a redução do número de clones nas lesões metastáticas é provavelmente conseqüência de uma pressão seletiva a qual são submetidas as células malignas durante a progressão tumoral, a partir de uma população celular inicial heterogênea.

KUUKASJARVI et al. (1997a), utilizando métodos de CGH e FISH, analisaram amostras de 29 tumores primários de mama e suas correspondentes metástases (localizadas em diversas regiões anatômicas, incluindo pulmão, medula óssea, cavidade abdominal, área supraclavicular, etc.). Em vinte casos foi observado um padrão muito semelhante de alterações genéticas entre os tumores primários e suas correspondentes metástases enquanto que em nove casos foi encontrado um padrão divergente. Entre as alterações observadas em comum nos dois grupos estudados estão: 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 no grupo metastático. Em outro estudo, NISHIZAKI et al. (1997), empregando 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 comparado com os tumores primários, sendo que nos últimos observou-se alta freqüência 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.

TSUDA et al. (1999), utilizando FISH, detectaram uma translocação envolvendo os cromossomos 1 e 16 em amostras primárias de câncer de mama,

sendo que essa alteração estava significativamente associada com a não recorrência da doença e uma melhor taxa de sobrevivência, especialmente quando pacientes linfonodo-positivas foram consideradas.

POPLAWSKI et al. (2010) também utilizaram CGH-array para analisar 13 amostras pareadas de tumor primário e metástase nos linfonodos axilares de pacientes com câncer de mama. Nesse estudo, os tumores primários apresentaram um maior número de alterações do que as metástases, sendo observadas diferenças entre as lesões primárias e as metástases correspondentes. As regiões de ganhos mais comuns foram 1q, 8q, 11q, 16p, 17q e 20q, e as de perdas foram 1p, 8p, 11q, 16q e 17p. Além disso, muitas alterações descritas já haviam sido associadas com uma baixa sobrevida, sugerindo que este é um método viável para a identificação de marcadores de progressão da doença e de novos alvos para o tratamento.

Os estudos em amostras pareadas se concentram na sua maioria na análise de tumores primários e metástases mamárias presentes nos linfonodos ou em sítios mais distantes (PANDIS et al., 1994, 1998; TEIXEIRA et al., 1996, 2002; BERNARDINO et al., 1997; KUUKASJARVI et al., 1997a, b; NISHIZAKI et al., 1997). CAVALLI et al. (2003) apresentaram as primeiras informações deste tipo de análise realizada especificamente no linfonodo sentinela. Estes autores apresentaram dados preliminares de alterações cromossômicas em 6 casos de metástases no LNS e em seus tumores primários correspondentes. Apesar de nenhuma diferença significativa ter sido encontrada entre os dois grupos amostrais quando o número total de alterações cromossômicas foi comparado quanto à complexidade cariotípica, foram detectadas algumas alterações com maior frequência no LNS, como por exemplo, perdas em 6q13-q23 e 13q13-q32 e ganhos em 9q31-qter, 11p15-21, 12q23-qter, 16p e 20q12-qter. Num trabalho seguinte do mesmo grupo, SANTOS et al. (2008) também utilizaram o método de CGH em análises de metástases em 20 LNS e seus correspondentes tumores primários. Os autores observaram que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados e que os ganhos de cópias de DNA foram mais freqüentes do que as perdas. Foi encontrada uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre as alterações do número de cópias de DNA por cromossomo observadas nos tumores primários e nas metástases nos LNS correspondentes. As alterações mais freqüentemente detectadas em ambas as lesões foram ganhos nos cromossomos 1p, 16, 17, 19 e 20

e perdas em 6q e 13q. Os cromossomos 1, 6, 16 e 20 foram freqüentemente envolvidos nas alterações identificadas nas metástases dos LNS. Os autores concluíram que, mesmo com a divergência clonal e a heterogeneidade genética que caracterizam o processo metastático, foi possível identificar um padrão de alterações genéticas que podem controlar este processo.

WANG et al. (2009) utilizaram *CGH-array* para comparar os genomas de tumores de mama primários com os das metástases em LNS e também em linfonodos mais distantes. Nesse trabalho também foi analisado o perfil genômico de tumores de mama que não metastatizaram. Os autores observaram uma alta similaridade entre os tumores e suas metástases linfonodais correspondentes, assim como uma similaridade entre as metástases nos LNS e nos demais linfonodos. Os ganhos mais frequentes nos tumores com metástases linfonodais foram em 5q, 2q, 12q, 2p, 9q e 17q, sendo que ganhos em 17q23 e 17q24 foram associados com a presença de metástases linfonodais, invasão linfovascular e tamanho tumoral.

As análises por CGH e *CGH-array* de amostras pareadas, nos estudos citados acima e outros (HAN et al., 2006; TORRES et al., 2007; FRIEDRICH et al., 2008;), revelaram, em geral, um padrão similar de alterações genéticas no tumor primário e nos tumores metastáticos, identificando apenas poucas alterações genéticas únicas às metástases linfonodais, o que contrasta com dados iniciais obtidos por citogenética clássica (PANDIS et al., 1994, 1998; TEIXEIRA et al., 1996). Os dados de CGH e *CGH-array*, combinados com a teoria de que apenas um pequeno número de células de uma população inicial heterogênea no tumor primário adquire uma capacidade metastática (ou mutações promotoras de metástase), sugerem que eventos relativamente discretos separam a metástase linfonodal do tumor primário correspondente (HUNTER e ALSARRAJ, 2009). Desta forma, as alterações genéticas que podem determinar o desenvolvimento de metástases e a recorrência do câncer de mama já estão, provavelmente, presentes nos tumores primários no momento do diagnóstico. É estimado que 60-70% das pacientes já apresentam o processo metastático iniciado ao diagnóstico do câncer de mama (SCHIMIDT-KITTLER et al., 2003).

A caracterização de alterações cromossômicas e de número de cópias de DNA presentes no LNS pode identificar eventos genéticos iniciais do processo metastático, diferenciando-os dos que ocorrem em sítios metastáticos mais distantes da mama. A capacidade do método de CGH e de *CGH-array* em fornecer

comparações detalhadas de alterações genéticas em amostras pareadas permite o estudo da progressão metastática e pode auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem este processo (FOROZAN et al., 1997; KUUKASJARVI et al., 1997b; REIS-FILHO et al., 2005).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância clínica da análise do linfonodo sentinela na predição de metástases axilares mamárias e que não há marcadores genéticos capazes de informar sobre a presença ou ausência de metástases no referido linfonodo, é de importância que se intensifiquem pesquisas para que este objetivo seja alcançado. Em particular, estudos investigando detalhadamente as regiões cromossômicas mais frequentemente alteradas no LNS e nos tumores primários correspondentes, pela utilização de métodos com alto poder de resolução como CGH e CGH-*array*, podem identificar genes nelas situados com função importante no desenvolvimento e progressão das metástases axilares mamárias. Estes genes (ou seus produtos) poderão ser utilizados como marcadores moleculares auxiliando significativamente na detecção de células tumorais no LNS o que é fundamental para a predição precoce (numa fase inicial) de metástases e da recorrência da doença em pacientes com câncer de mama.

4. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo é identificar a presença de alterações de número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano em metástases nos linfonodos sentinela, em comparação com os tumores primários correspondentes, utilizando os métodos de CGH e CGH-*array*.

Objetivos específicos:

1. Obter o perfil geral das alterações de número de cópias de DNA detectadas pelo CGH e pelo CGH-*array* em cada grupo amostral;
2. Comparar estatisticamente as alterações observadas, pelas duas técnicas, por caso e por cromossomo;
3. Identificar as alterações compartilhadas pelos casos, em ambas as técnicas;
4. Identificar as alterações mais frequentes nos tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela pelas duas técnicas;
5. Validar os resultados de CGH-*array* em genes específicos, utilizando as técnicas de FISH e de PCR em tempo real para número de cópias;
6. Correlacionar as alterações mais frequentes com a localização de genes envolvidos na tumorigênese mamária e suas respectivas funções.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

As amostras de carcinomas mamários e metástases nos linfonodos sentinela correspondentes foram coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, no período de Janeiro de 2009 a Janeiro de 2010. Foram disponibilizadas 15 amostras pareadas de TP e LNS correspondentes, provenientes de blocos de tecido parafinado fixado em formalina e armazenados nos Laboratórios de Anatomia Patológica dos referidos hospitais. Os experimentos de CGH, CGH-array, FISH e PCR em tempo real foram realizados na Universidade de Georgetown, Washington DC., EUA, sob supervisão da Dr^a. Luciane Regina Cavalli e do Dr. Bassem Haddad. As amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento pelas pacientes, cujos dados clínicos e histopatológicos são constantemente atualizados e podem ser facilmente acessados pelo clínico responsável (Anexo 1). Este projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), Brasília, registro número 7220, de 20 de fevereiro de 2003 e aprovado pela Comissão de ética (IRB-Institutional Review Board) da Universidade de Georgetown, registro número 2004-146, de 18 de maio de 2004 (Anexo 2).

5.1.1. Caracterização da amostra

Foram estudadas amostras parafinadas de carcinomas mamários e seus linfonodos sentinela correspondentes de 15 pacientes do sexo feminino, caucasóides, não aparentados e com idade média igual a $54,00 \pm 11,16$ anos. Das 15 pacientes, duas eram portadoras de carcinoma mamário classificado histologicamente como carcinoma ductal invasivo grau I, seis de carcinomas ductais invasivos grau II e uma de carcinoma ductal invasivo grau III; três pacientes apresentaram carcinoma lobular invasivo. Em três pacientes não foi determinado o grau histológico tumoral. A média do tamanho dos carcinomas estudados foi igual a $3,02 \pm 1,82$ cm (Tabela 1).

Tabela 1: Dados clínico-histopatológicos das pacientes.

Amostra	Idade (anos)	TT (cm)	Patologia	GH
1	73	3,0	CDI	II
2	69	1,8	CDI	si
3	55	2,5	CLI	si
4	45	4,5	CLI	II
5	53	1,8	CDI	II
6	61	8,0	CDI	III
7	58	2,0	CDI	III
8	57	3,0	CDI	I
9	35	3,2	CTB	II
10	67	1,4	CDI	II
11	48	5,5	CDI	II
12	48	0,7	CLI	si
13	54	2,9	CDI	II
14	53	3,0	CDI	II
15	34	2,0	CDI	I

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

5.2. Procedimentos Técnicos

5.2.1. Microdissecção Celular e Extração de DNA

Para cada bloco de tecido parafinizado, foi realizado um corte de espessura de 4µm que 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 parafinizado foi tratado com xilol para remoção da parafina e, em seguida, tratado com etanol 100% para desidratação do material. A extração de DNA foi realizada utilizando-se fenol e clorofórmio. Após a extração do DNA, o mesmo foi analisado em gel de agarose (2%) para determinar a qualidade e foi quantificado em espectrofotômetro.

5.2.2. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

O método de CGH foi realizado em 10 casos pareados de TP e LNS, de acordo com os procedimentos descritos por FIGUEIREDO et al. (1999), com as seguintes etapas:

Marcação por fluorescência do DNA teste e DNA controle: *Nick Translation* (FEINBERG, 1983) foi realizado 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 precipitados na presença 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 cariotipicamente normal foram submetidas a um pré-tratamento em solução de 2XSSC (NaCl/citrato de sódio). Posteriormente, o material foi submetido à solução de desnaturação (70% formamida / 30% 2xSSC pH 7.0) a 80°C e desidratado 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. Essa foi selada e incubada em estufa por pelo menos 72 horas a 37°C.

Lavagem pós-hibridização: Após a hibridização, o material foi lavado em solução de 50% de formamida para remoção de moléculas repórteres (fluorocromos) não hibridizados. A seguir, o material foi exposto a uma solução bloqueadora de ligações não-específicas durante a detecção.

Detecção: Utilizamos 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*).

5.2.2.1. Obtenção das Imagens

As imagens do DNA tumoral marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína), do DNA controle marcado com TRITC (isotiocianato de tetrametil rodamina) e do contracorante DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) 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).

5.2.2.2. 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 foi computada como o valor médio de 5 a 10 imagens obtidas para identificar as alterações no número de cópias em todos os casos. Ganhos são considerados quando a razão obtida é maior que 1,25 e amplificação quando a razão é maior que 1,5. Perdas são consideradas quando a razão é menor que 0,75 e deleções quando a razão é menor que 0,5. A interpretação dos perfis foi realizada independentemente por dois observadores.

5.2.3. CGH-array

O método de CGH-array foi realizado em 10 casos pareados de TP e LNS, utilizando-se a plataforma de *arrays* (microarranjos) humanos, no formato de 1x 44K (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) contendo sondas específicas para todo o genoma humano, baseado no *database* do HG19 (*human genome 19*).

Digestão: 3 µg de DNA da amostra tumoral e de referência (DNA de um indivíduo sem câncer) foram digeridos, utilizando-se as enzimas *AluI* (10U/µl) e *RSaI* (10U/µl) por um período de 2 horas.

Marcação: Foi utilizado o *Bioprime Array CGH genomic labeling kit* (Invitrogen, Inc). As amostras tumorais foram marcadas com Cy3 (fluorocromo cianina 3 - verde) e os controles com Cy5 (fluorocromo cianina 5 - vermelho).

Hibridização: As amostras foram hibridizadas na presença de *Cot-1* DNA e *Blocking Agent* (10x) a 65°C, em rotação de 20rpm por 40 horas, seguindo-se as instruções do fabricante (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA).

Lavagem: A lavagem foi realizada em câmara especial com controle de ozônio. Após essa etapa, os *arrays* foram escaneados utilizando -se o *scanner* da empresa Agilent.

5.2.3.1. Obtenção e análise das imagens

Após a avaliação da qualidade de hibridização de cada experimento e normalização dos dados pelo *software Feature Extraction software v9.5* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA), estes foram analisados pelo *software Genomics Workbench 6.5, Agilent CGH analytics*, utilizando-se o algoritmo ADM-2 (*threshold* de 6.0) e filtros de análise apropriados. Amplificações e deleções foram consideradas na presença de um número mínimo de 3 sondas consecutivas, com valores superiores a $\log_2(7/6)$ e inferiores a $\log_2(5/6)$, respectivamente.

5.2.4. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Para a validação dos dados de CGH-array em relação ao número de cópias dos genes *BP1* e *HER2* utilizamos o método de FISH (alterações nestes genes foram também validadas pelo método de PCR em tempo real, ver próximo item 3.2.5). As hibridizações de 10 casos pareados de TP e LNS foram realizadas em secções de tecido em parafina dos pacientes, com sondas construídas especificamente (a partir de clones de *Bacterial Artificial Chromosomes* – BACs) para os genes *BP1* e *HER2*.

Anteriormente à hibridização, o tecido foi desparafinado com Xilol, desidratado com etanol 100%, digerido com pepsina por 90 minutos e desidratado em uma série de etanol (70, 90 e 100%). O material foi então desnaturado em temperatura elevada em 70% formamida/SSC e desidratado com etanol gelado (70, 90, 100%).

As sondas foram preparadas com a presença de *Cot-1* DNA, desnaturadas por calor e incubadas a 37°C por aproximadamente 1 hora. Após essa etapa, o

material foi hibridizado e a incubação foi realizada em câmara úmida, a 37°C, *overnight*.

Após a hibridização, foram realizadas as lavagens de estringência com 50% formamida e 1xSSC, a 42°C. A detecção das sondas foi similar a utilizada para o CGH.

5.2.4.1. Análise e contagem dos sinais de hibridização

As imagens digitais foram obtidas no microscópio Leica DMRBE (Leica, Wetzlar, Germany) equipado com filtros ópticos e uma câmera fotográfica (Photometrics, Tucson, AZ). No mínimo 100 células em intérfase foram avaliadas em cada amostra, por dois observadores independentes.

5.2.5. PCR em tempo real

Para a validação dos dados de CGH-array em relação ao número de cópias dos genes *AKT1*, *AKT2*, *BP1*, *FGFR2*, *HER2*, *PI3KCA* e *PTEN* foi utilizada a plataforma da *Applied Biosystems*, através do sistema *TaqMan copy number assay*, em 9 casos pareados de TP e LNS, seguindo as instruções do fabricante. Como o método é baseado em uma reação de PCR em tempo real, será referido e abreviado neste trabalho como PCR em tempo real. Nesse sistema são usados 3 grupos de oligonucleotídeos: *sense*, *antisense* e a sonda de sequência específica ligada à um fluoróforo e um *quencher*. A molécula *quencher*, quando mantida próxima ao fluoróforo, absorve sua energia e não há emissão de fluorescência. Durante a amplificação, o fluoróforo é liberado e sua fluorescência é detectada pelo equipamento. As curvas de amplificação da PCR mostram a quantidade de fluorescência emitida na fase exponencial da amplificação, que é então utilizada para calcular a quantidade do material inicial.

Foram realizados ensaios diferentes para cada gene, utilizando-se o gene RNase P como controle interno (*reference assay*). As amostras que não apresentaram sinal de fluorescência para esse gene controle foram excluídas da análise.

5.2.5.1. Obtenção e análise dos dados

Os dados foram obtidos através do *software Real-Time PCR System* e analisados pelo *CopyCaller™ Software v1.0 – Applied Biosystems*.

5.3. Análise Estatística

O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar a casualidade de ocorrência das alterações do número de cópias de DNA nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela e para avaliar a homogeneidade da distribuição das alterações nos tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela.

Para verificar a significância das diferenças dos quadrados médios dos dados amostrais foi aplicado o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett, condição exigida para a análise da significância das diferenças entre as médias pela análise da variância. O Teste *t* de Student foi utilizado para verificar a significância das diferenças entre médias.

O coeficiente de regressão foi utilizado para avaliar o grau de dependência do número das alterações (ganhos, perdas e total de alterações, separadamente) observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

Todos os testes acima mencionados foram utilizados de acordo com as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988) e o Teste de Duncan, para a comparação entre as médias de alterações cromossômicas observadas nos casos analisados, foi aplicado conforme PIMENTEL-GOMES (1976).

As análises estatísticas dos dados obtidos por *CGH-array* e *PCR* em tempo real foram avaliadas pelos programas *Genomic Workbench*, *Agilent* (versão 6.5) e *CopyCaller™ Software v1.0 – Applied Biosystems*, respectivamente.

6. RESULTADOS

Quinze pares de tumor primário (TP) e linfonodos sentinela (LNS) correspondentes foram disponibilizados para esse estudo e analisados quanto a alteração do número de cópias de DNA pelos métodos de CGH, CGH-*array*, FISH e RT-PCR. Na tabela abaixo, estão apresentados os números de casos analisados especificamente para cada método. Em alguns casos não foi possível a avaliação do número de cópias de DNA por todos os métodos, devido a insuficiência e/ou qualidade insatisfatória do DNA genômico.

Tabela 2: Casos pareados e técnicas efetuadas.

Casos	CGH	CGH-<i>array</i>	FISH	RT-PCR
1	+	+	+	+
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	-	-	-
9	+	-	-	-
10	+	-	-	-
11	-	+	+	+
12	-	+	+	+
13	-	+	+	+
14	-	+	+	+
15	-	+	+	-

+: métodos realizados, -: métodos não realizados.

6.1.CGH

Foram obtidos resultados na análise de CGH de 10 dos 15 pares amostrais, sendo que alterações de número de cópias de DNA foram observadas em todos esses casos (Tabelas 3 e 4). Na Figura 2 está apresentado o perfil resultante da análise de CGH de um caso (A) e um esquema (B) ilustrando os critérios de análise utilizados para ganhos e ampliações (barras verdes) e perdas (barras vermelhas) de material genético.

Tabela 3: Alterações cromossômicas observadas nos tumores primários, por CGH.

Casos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C 1		+1pter~p33	+1p32~p12 +1q22~qter	+1p33~qter	+1q	+1q	+1pter~p33	++1pter~p32 +1q12~q44		-1pter~p34.1 +1p32~q42 ++2q22~q32
C 2										
C 3				-3p24~p13 +3q12~qter		++3q13.3~q23 +3q25~qter		+3pter~p22	+3p24~q12	
C 4			+4p13~q26		-4q21~q31	+4				+4
C 5		++5q23~q35.2	+5q11~q21				+5p			++5p15.3~q33
C 6			-6q23~qter	-6q	++6pter~p21.1		+6p -6q	++6q22~q27		++6p21.3~q23
C 7	+7p15~p11									
C 8				-8p +8q21.1~qter			++8q24~qter			
C 9						++9q33~qter	+9q33~qter	+9q		
C 10		+10p12~qter			+10p	+10p13~p11.2				
C 11				-11		+11p -11q23~qter		++11p15.1~p11.1 ++11q23~qter		
C 12										+12p12~q23
C 13			-13q	+13q	-13q13-q32		-13q13~q32			++13q21~q33
C 14										
C 15									-15q11.1~q14	
C 16	+16q	++16p11.2~q23	-16q12~qter		++16pter~q23	+16p	+16	+16q		-16
C 17				+17q24~qter	++17q22~qter		++17p12~qter			
C 18							-18q12~q22	+18p11.31~p11.1		
C 19		+19			+19	+19	+19	+19		
C 20					+20		++20q			
C 21				-21		+21q	+21			
C 22		+22			+22	+22q	+22			-22
C X	-X			-X				+Xp11.2~q27		+Xp11.2~q27

C1-CX: Cromossomo 1- cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda

Tabela 4: Alterações cromossômicas observadas nas metástases dos linfonodos sentinela, por CGH.

Casos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C 1	-1p	+1pter~p33				+1q	+1pter~p33	+1pter~p32		
C 2		+2q34~qter		+2p21~p13						
C 3	-3p									+3pter~p22
C 4			+4p16~p12			+4p16~q25				
C 5	+5		+5q11~q21		+5p13~q13	+5	+5p			
C 6		-6q16~q24		++6q22~qter	+6pter~p21.1		+6p -6q		+6pter~q16	
C 7										
C 8						-8	+8q24~qter	+8 ++8q23 ~ qter		
C 9				+9p	+9			+9		
C 10				-10		+10p13~p11.2				
C 11						++11pter~q21 -11q23~qter		+11q12 ~q13		
C 12	+12							+12q24.1 ~ qter		
C 13	-13q13~q32			-13q13~q32						+13q
C 14										
C 15										
C 16	+16p	+16p			+16p13.2~q23		+16	+16q11.2~q23		
C 17							+17			+17p
C 18	+18p						-18q12~q22	+18p11.31~p11.1		
C 19					+19		+19	++19		+19p13~q13.2
C 20	+20						++20q	+20		
C 21	+21					+21q				++21
C 22		+22			+22q11.1~q13.2		+22	+22		
C X					++X			++X		

C1 – CX: Cromossomo 1 – cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda.

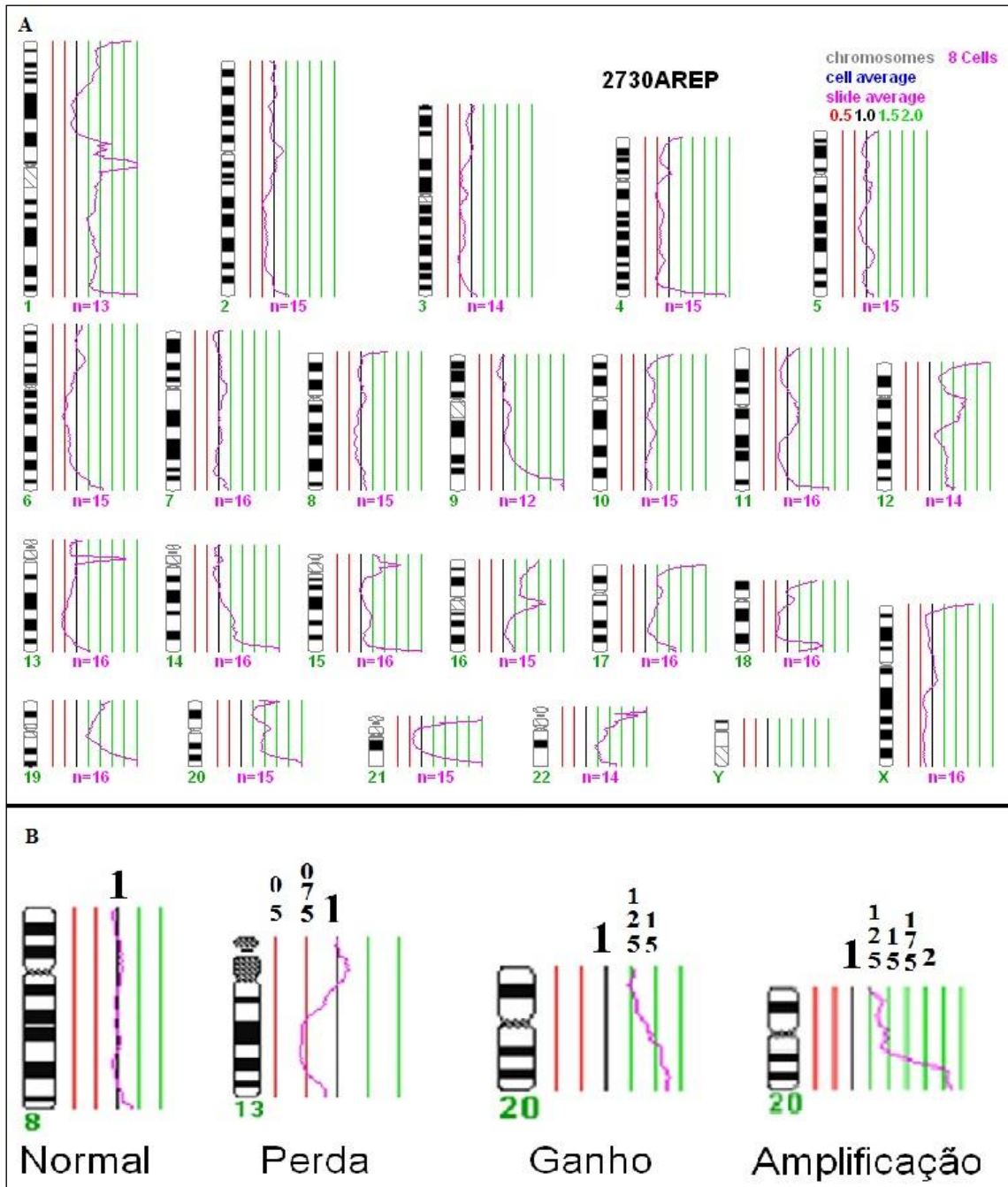


Figura 2: Perfil de CGH de um tumor primário (A). B: Esquema de análise do perfil de CGH - desvios da barra preta para a direita representam ganhos ou ampliações (barras verdes) e desvios para a esquerda representam perdas (barras vermelhas) de material genético.

Fonte: a autora (2011).

Vinte amostras pareadas de TP e metástases nos LNS foram analisadas por CGH em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2008). Esses dados (Anexo) foram incluídos na análise estatística dos dados de CGH do presente estudo, totalizando-se 30 amostras pareadas o número amostral final.

Os resultados das alterações cromossômicas **por caso** são apresentados nas tabelas a seguir. As freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas por caso, nos 30 tumores primários analisados estão apresentados na Tabela 5. Foram observadas 300 alterações cromossômicas, com uma média de $10,00 \pm 5,79$ alterações por caso. Os ganhos de cópias de DNA (209) foram mais freqüentes do que as perdas (91) ($\chi^2_{1} = 46,2$; $P < 0,001$, de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $6,97 \pm 3,55$ e $3,03 \pm 3,37$, respectivamente. Observou-se que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_{29} = 97,20$; $P < 0,001$), sendo que os casos 23 e 13 foram os que apresentaram um maior número de alterações cromossômicas, com 16 ganhos e 8 perdas (24 – 8,0%), 8 ganhos e 15 perdas (23 – 7,7%), respectivamente. Os casos 9 e 22 apresentaram o menor número de alterações (2 – 0,67%, em cada caso).

Na tabela 6 estão apresentadas as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas nas metástases nos linfonodos sentinela por caso. Foi encontrado um total de 256 alterações cromossômicas, com um número médio de $8,53 \pm 4,82$ alterações por caso. Os ganhos de cópias de DNA (175) foram mais freqüentes do que as perdas (81) ($\chi^2_{1} = 34,5$; $P < 0,001$ de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $5,83 \pm 3,26$ e de $2,70 \pm 2,29$, respectivamente. Da mesma forma de que nos tumores primários, as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso nos 30 linfonodos sentinela analisados ($\chi^2_{29} = 78,92$; $P < 0,001$). Os casos 23, com 16 ganhos e 9 perdas (25 – 9,8%), e 30, com 8 ganhos e 7 perdas (15 – 5,9%), apresentaram o maior número de alterações. Quatro casos, 3, 9, 20 e 21, apresentaram apenas 2 alterações cromossômicas (0,8%).

Nos gráficos 1 a 3 estão ilustradas a distribuição do número de ganhos, perdas e total de alterações cromossômicas observadas nos 30 casos de tumores primários e metástases nos linfonodos sentinela, respectivamente.

Tabela 5: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em tumores primários por caso.

C	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	2	1	6	0	4	3	5	6	8	2	11	1	11	3	11	0	1	1	8	3
%	1,0	1,1	2,9	0	1,9	3,3	2,4	6,6	3,8	2,2	5,3	1,1	5,3	3,3	5,3	0	0,5	1,1	3,8	3,3
TG	3		6		7		11		10		12		14		11		2		11	
%	1,0		2,0		2,3		3,7		3,3		4,0		4,7		3,7		0,7		3,7	

Continua

Continuação

C	11*		12*		13*		14*		15*		16*		17*		18*		19*		20*	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	7	4	5	2	8	15	5	4	7	2	14	3	6	1	5	1	12	7	6	0
%	3,3	4,4	2,4	2,2	3,8	16,5	2,4	4,4	3,3	2,2	6,7	3,3	2,9	1,1	2,4	1,1	5,7	7,7	2,9	0
TG	11		7		23		9		9		17		7		6		19		6	
%	3,7		2,3		7,7		3,0		3,0		5,7		2,3		2,0		6,3		2,0	

Continua

Continuação

C	21*		22*		23*		24*		25*		26*		27*		28*		29*		30*		Total	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	8	6	2	0	16	8	4	0	4	0	7	4	9	2	4	3	9	9	4	0	209	91
%	3,8	6,6	1,0	0	7,7	8,8	1,9	0	1,9	0	3,3	4,4	4,3	2,2	1,9	3,3	4,3	9,9	1,9	0	70,0	30,0
TG	14		2		24		4		4		11		11		7		18		4		300	
%	4,7		0,7		8,0		1,3		1,3		3,7		3,7		2,3		6,0		1,3			

C: Caso; F: Frequência; TP: Total parcial; TG: Total geral; G: Ganhos; P: Perdas; *: amostras de Santos et al., 2008, nos Anexos

Tabela 6: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em metástases dos linfonodos sentinela por caso.

C	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	6	3	4	1	2	0	3	2	7	0	6	2	9	2	12	0	2	0	4	0
%	3,4	3,7	2,3	1,2	1,1	0	1,7	2,5	4,0	0	3,4	2,5	5,1	2,5	6,9	0	1,1	0	2,3	0
TG	9		5		2		5		7		8		11		12		2		4	
%	3,5		2,0		0,8		2,0		2,7		3,1		4,3		4,7		0,8		1,6	

Continua

Continuação

C	11*		12*		13*		14*		15*		16*		17*		18*		19*		20*	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	8	4	4	1	9	4	8	4	6	4	2	5	4	3	9	4	3	6	2	0
%	4,6	4,9	2,3	1,2	5,1	4,9	4,6	4,9	3,4	4,9	1,1	6,2	2,3	3,7	5,1	4,9	1,7	7,4	1,1	0
TG	12		5		13		12		10		7		7		13		9		2	
%	4,7		2,0		5,1		4,7		3,9		2,7		2,7		5,1		3,5		0,8	

Continua

Continuação

C	21*		22*		23*		24*		25*		26*		27*		28*		29*		30*		Total	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	2	0	5	1	16	9	6	3	9	4	6	3	5	4	4	4	4	1	8	7	175	81
%	1,1	0	2,9	1,2	9,1	11,1	3,4	3,7	5,1	4,9	3,4	3,7	2,9	4,9	2,3	4,9	2,3	1,2	4,6	8,6	68,4	31,6
TG	2		6		25		9		13		9		9		8		5		15		256	
%	0,8		2,3		9,8		3,5		5,1		3,5		3,5		3,1		2,0		5,9			

C: Caso; F: Frequência; TP: Total parcial; TG: Total geral; G: Ganhos; P: Perdas; *: amostras de Santos et al., 2008, nos Anexos

Gráfico 1: Distribuição do número de ganhos por caso encontrados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

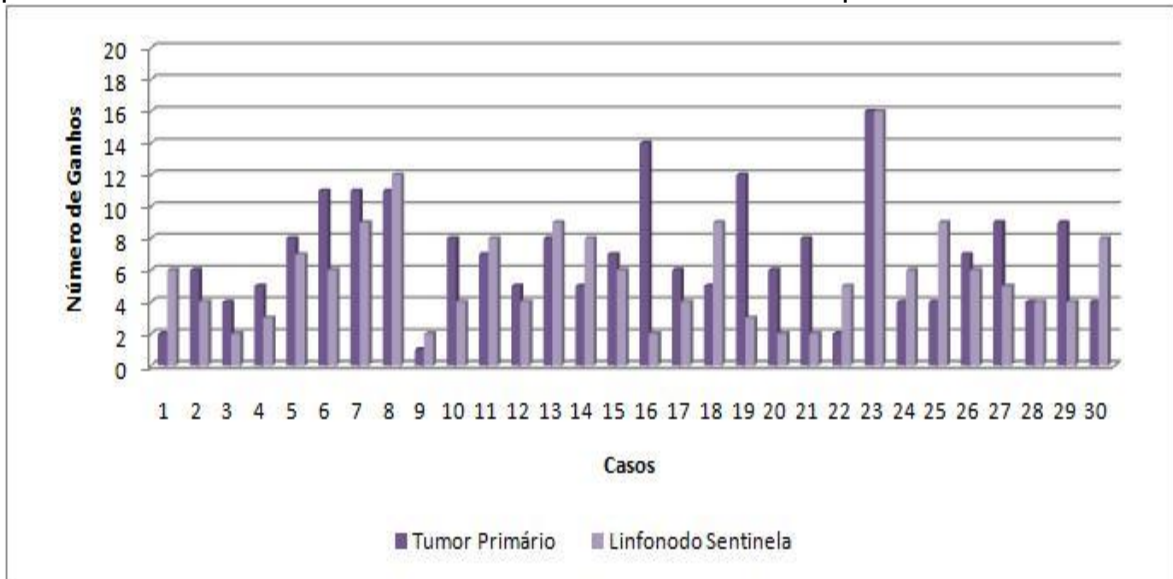


Gráfico 2: Distribuição do número de perdas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

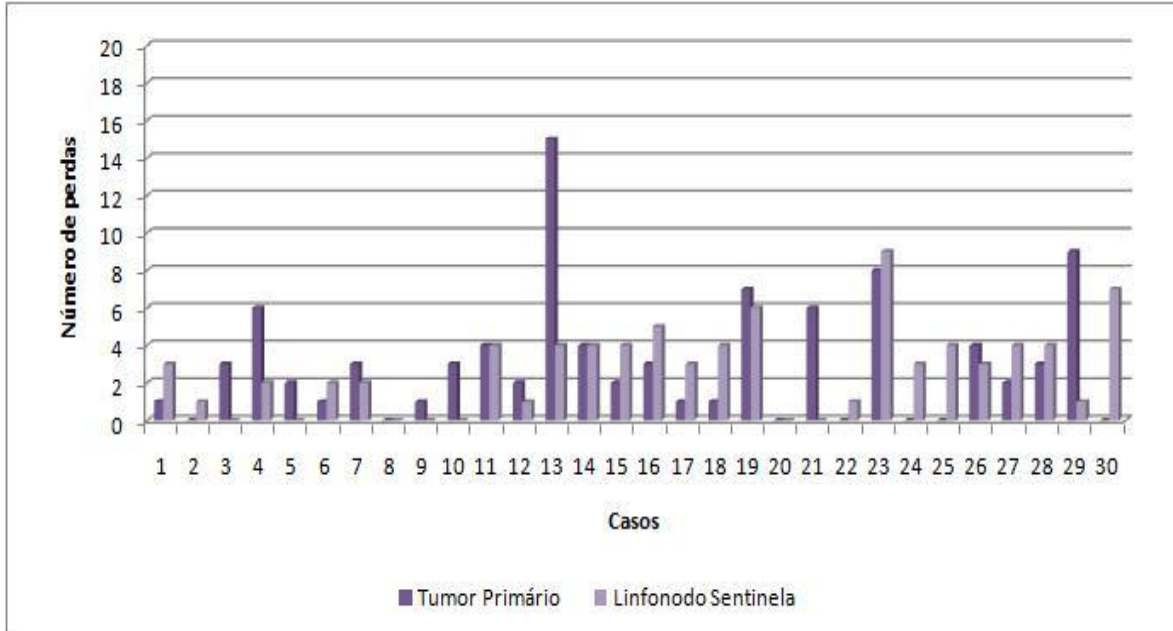
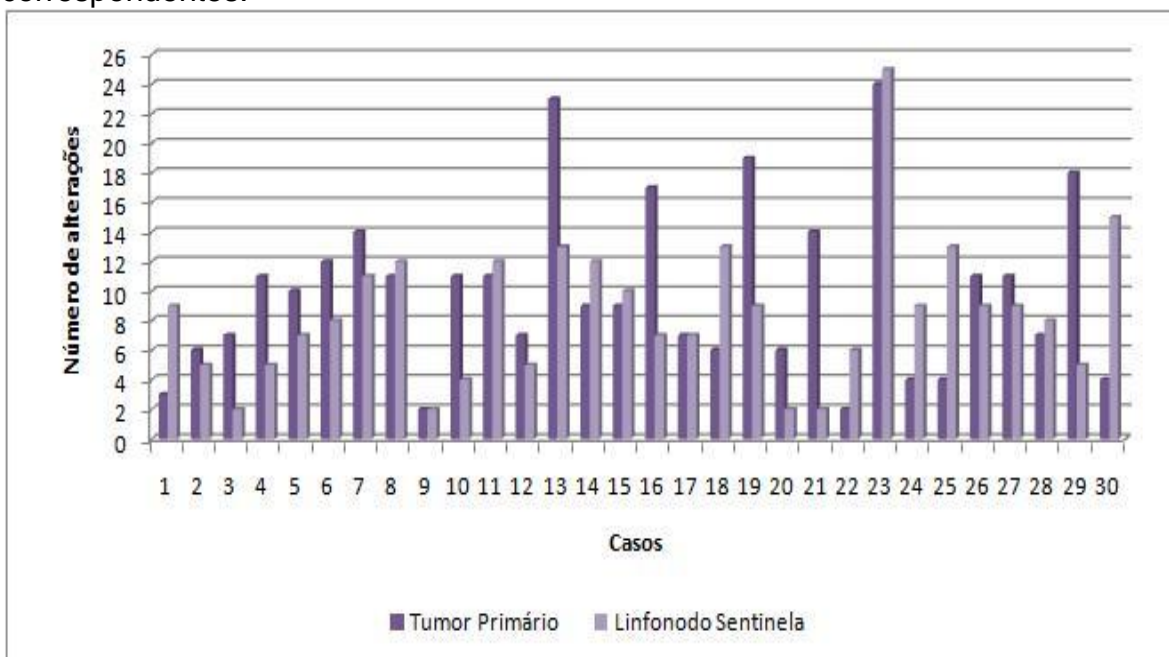


Gráfico 3: Distribuição do número total de alterações cromossômicas por caso encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.



Nas tabelas a seguir estão apresentados os resultados referentes às alterações cromossômicas **por cromossomo**. Na tabela 7 estão apresentadas as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em tumores primários por cromossomo. Observou-se que as 300 alterações encontradas nos tumores primários (média de $13,04 \pm 7,70$ alterações por cromossomo) não se distribuíram ao acaso por cromossomo ($\chi^2_{22} = 100,05$; $P < 0,001$). Os cromossomos com maior número de alterações foram o 1, com 29 ganhos e 5 perdas (34 – 11,3%), e 16, com 22 ganhos e 3 perdas (25 – 8,3%), sendo que esses também foram os que apresentaram o maior número de ganhos (13,9% e 10,5%, respectivamente). Os cromossomos com menor número de alterações foram o 10 (4 – 1,3%), 14 (1 – 0,3%) e 15 (3 – 1%). O maior número de perdas ocorreu nos cromossomos 6 e 13 (14 – 15,4%), e X (12 – 13,2%). Nos cromossomos 10, 14, 17, 19 e 20 as mesmas não foram observadas. O número médio de ganhos de cópias de DNA foi igual a $9,09 \pm 7,69$ e o de perdas foi igual a $3,96 \pm 4,22$.

Na tabela 8 estão apresentadas as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo. O número médio das alterações observadas foi de $11,13 \pm 6,51$ alterações por cromossomo. Assim como nos tumores primários, foi observado que

Tabela 7: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em tumores primários por cromossomo.

CR	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	29	5	2	6	7	3	3	6	5	3	7	14	3	2	6	4	8	2	3	0	9	6	8	4
%	13,9	5,5	1,0	6,6	3,3	3,3	1,4	6,6	2,4	3,3	3,3	15,4	1,4	2,2	2,9	4,4	3,8	2,2	1,4	0	4,3	6,6	3,8	4,4
TG	34		8		10		9		8		21		5		10		10		3		15		12	
%	11,3		2,7		3,3		3,0		2,7		7,0		1,7		3,3		3,3		1,0		5,0		4,0	

Continua

Continuação

CR	13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		X		Total	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	2	14	1	0	2	2	22	3	14	0	7	3	21	0	21	0	10	1	15	1	4	12	209	91
%	1,0	15,4	0,5	0	1,0	2,2	10,5	3,3	6,7	0	3,3	3,3	10,0	0	10,0	0	4,8	1,1	7,2	1,1	1,9	13,2	70,0	30,0
TG	16		1		4		25		14		10		21		21		11		16		16		300	
%	5,3		0,3		1,3		8,3		4,7		3,3		7,0		7,0		3,7		5,3		5,3			

CR: Cromossomo; F: Frequência; TP: Total parcial; TG: Total geral; G: Ganhos; P: Perdas

Tabela 8: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em metástases dos linfonodos sentinela por cromossomo.

CR	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	21	6	3	8	1	2	3	6	6	5	9	13	0	1	8	1	8	0	2	2	7	2	6	1
%	12,0	7,4	1,7	9,9	0,6	2,5	1,7	7,4	3,4	6,2	5,1	16,0	0	1,2	4,6	1,2	4,6	0	1,1	2,5	4,0	2,5	3,4	1,2
TG	27		11		3		9		11		22		1		9		8		4		9		7	
%	10,5		4,3		1,2		3,5		4,3		8,6		0,4		3,5		3,1		1,6		3,5		2,7	

Continua

Continuação

CR	13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		X		Total	
F	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	2	12	1	1	2	2	15	2	11	0	6	5	19	0	16	0	10	0	16	0	3	12	175	81
%	1,1	14,8	0,6	1,2	1,1	2,5	8,6	2,5	6,3	0	3,4	6,2	10,9	0	9,1	0	5,7	0	9,1	0	1,7	14,8	68,4	31,6
TG	14		2		4		17		11		11		19		16		10		16		15		256	
%	5,5		0,8		1,6		6,6		4,3		4,3		7,4		6,3		3,9		6,3		5,9			

CR: Cromossomo; F: Frequência; TP: Total parcial; TG: Total geral; G: Ganhos; P: Perdas

a distribuição de alterações cromossômicas não ocorreu ao acaso entre os cromossomos ($\chi^2_{22} = 83,79$; $P < 0,001$). O número médio de ganhos de cópias de DNA foi igual a $7,61 \pm 6,16$ e o de perdas foi igual a $3,52 \pm 4,17$. Os cromossomos com maior número de alterações foram os de número 1, com 21 ganhos e 6 perdas (27 – 10,5%), e 6, com 9 ganhos e 13 perdas (22 – 8,6%). Os cromossomos com menor número de alterações foram o 7 (1 – 0,4%) e 14 (2 – 0,8%). O cromossomo 1 apresentou o maior número de ganhos de regiões cromossômicas (21 – 12,0%), seguido pelo cromossomo 19, com 19 ganhos (10,9%). No cromossomo 7 nenhum ganho foi observado. O maior número de perdas ocorreu nos cromossomos 6 (13 – 16,0%) e 13 e X (12 – 14,8%, em cada), sendo que nos cromossomos 9, 17, 19, 20, 21 e 22 as mesmas não foram observadas.

Nos gráficos 4 a 6 estão ilustradas, respectivamente, a distribuição do número de ganhos, de perdas e do total de alterações cromossômicas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 23 cromossomos.

Gráfico 4: Distribuição do número de ganhos por cromossomo encontrados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

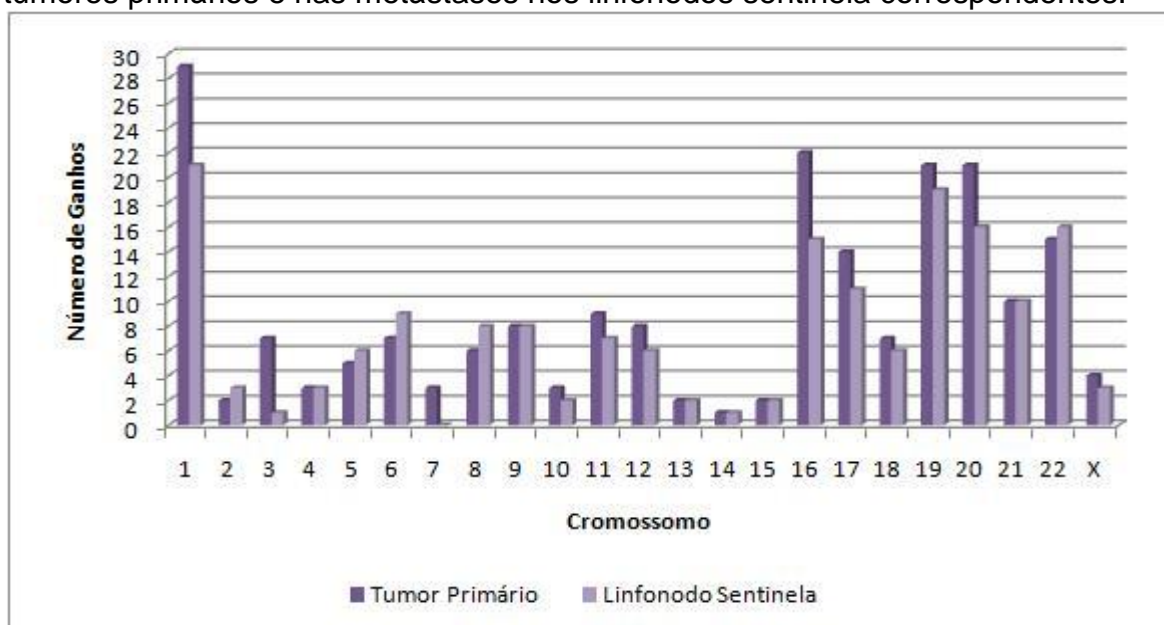


Gráfico 5: Distribuição do número de perdas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

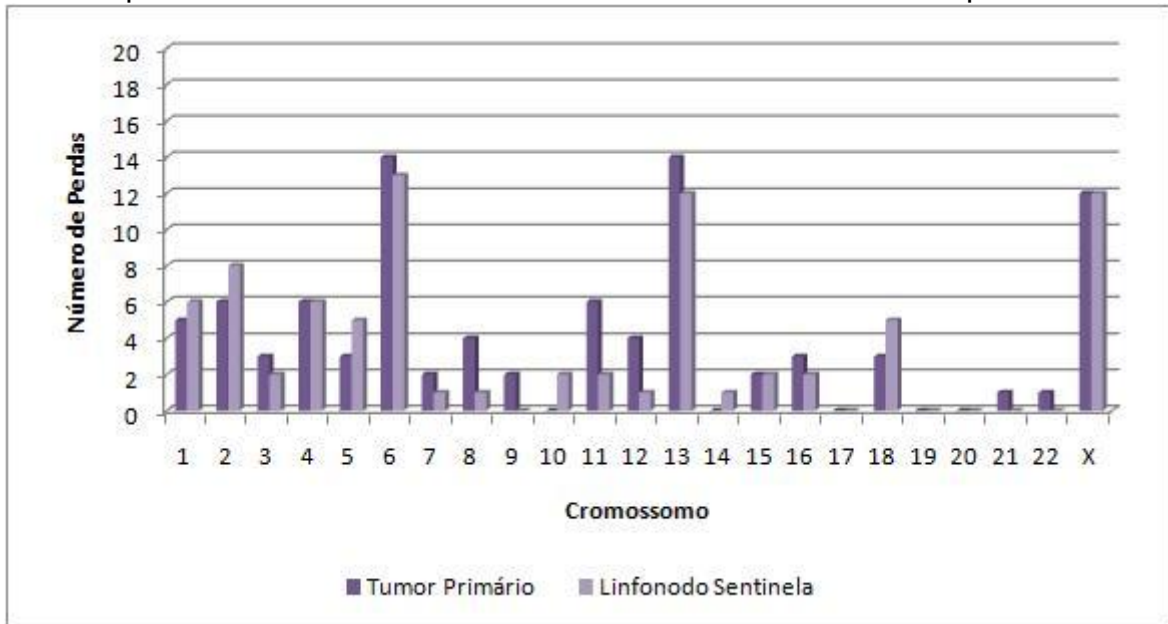
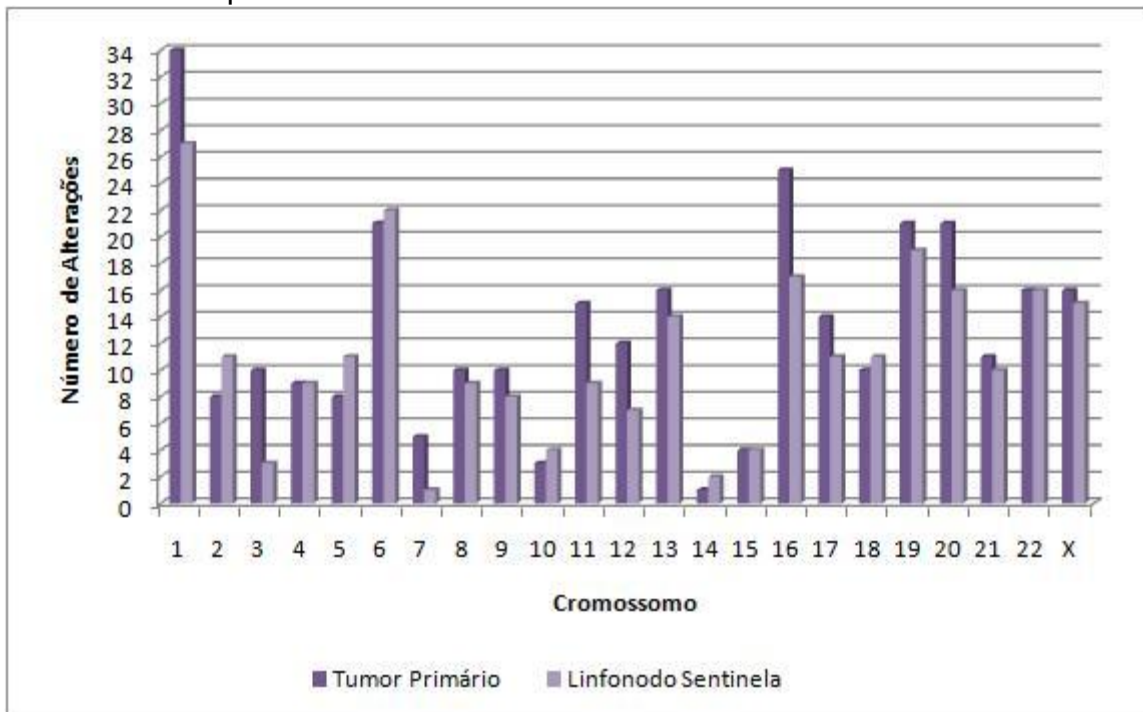


Gráfico 6: Distribuição do número total de alterações cromossômicas por cromossomo encontradas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.



Na tabela 9 estão resumidas as informações por caso e por cromossomo sobre as médias de ganhos e perdas de alterações cromossômicas, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela analisados neste trabalho.

Tabela 9: Médias de ganhos (n= 209 e 175) e perdas (n=91 e 81) cromossômicas, observadas por CGH, por caso e por cromossomo nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela, respectivamente.

TUMORES PRIMÁRIOS						
Alteração	Caso			Cromossomo		
	Ganho	Perda	Total	Ganho	Perda	Total
Média ± DP	6,97 ± 3,55	3,03 ± 3,37	10,00 ± 5,79	9,09 ± 7,69	3,96 ± 4,22	13,04 ± 7,70

Continua

Continuação

LINFONODOS SENTINELA						
Alteração	Caso			Cromossomo		
	Ganho	Perda	Total	Ganho	Perda	Total
Média ± DP	5,83 ± 3,26	2,70 ± 2,29	8,53 ± 4,82	7,61 ± 6,16	3,52 ± 4,17	11,13 ± 6,51

A estes dados foi aplicado o teste Bartlett . Para os casos, este teste indicou um valor de $\chi^2_{(3)\text{corr}}$ igual a 6,09; $P>0,10$, demonstrando que os quadrados médios do número de aberrações cromossômicas nos casos analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, o que permitiu comparar as várias médias amostrais simultaneamente através da análise da variância, cujos resultados são apresentados na Tabela 10. Nesta Tabela, observa-se que houve diferença significativa, a 0,05, entre as aberrações cromossômicas (ganhos e perdas) nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela analisadas nos 30 casos. Desta forma, foi aplicado o teste de Duncan, que permite comparar todo e qualquer contraste entre duas médias das quatro de ganhos e perdas para casos, conforme apresentado na Tabela 9. Este teste indicou diferenças significativas somente entre a média de ganho de aberrações cromossômicas no tumor primário (6,97) quando comparada com as médias de perdas de aberrações cromossômicas, tanto nas metástases nos linfonodos sentinela (2,70) ($D_4= 3,93<4,27$), como nos tumores primários (3,03) ($D_3=3,81<3,94$).

Tabela 10: Análise da variância das médias das aberrações cromossômicas observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.

Variação	G.L.	SQ	$s^2(x)$	F	G.L.	P
Entre tumores	1	16,14	16,14	1,62	1; 116	> 0,05
Entre aberrações	1	374,54	374,54	37,64	1; 116	< 0,05
Interação	1	4,78	4,78	0,48	1; 116	> 0,05
Entre tumores e entre aberrações	3	395,46	131,82	13,25	3; 116	< 0,05
Resíduo	116	1154,08	9,95			
Total	119	1549,54				

Para cromossomos (Tabela 9), o teste de Bartlett apresentou um valor de $\chi^2_{(3)\text{corr}}$ igual a 12,02; $P<0,05$ indicando que os quadrados médios do número de aberrações cromossômicas nos 23 cromossomos analisados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Este resultado inviabilizou a análise da variância desde que a condição *sine quo non* para aplicá-la é que não haja diferença significativa entre os quadrados médios dos dados amostrais. Desta forma, avaliamos a significância das diferenças entre as médias, através do teste *t* de Student. O rigor estatístico permite a comparação entre somente três das quatro médias de aberrações cromossômicas

(perdas e ganhos) observadas nos 23 cromossomos, nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela. Assim, baseados na análise anterior, nos 30 casos, que demonstrou que a média de ganhos nos tumores primários apresentou diferenças significativas quando comparada tanto com as médias de perdas nas metástases nos linfonodos sentinela como nos tumores primários e observando ainda o valor das médias de aberrações cromossômicas nos 23 cromossomos (Tabela 9), as mesmas comparações foram feitas. Os seguintes resultados foram observados: 1) média de ganhos no tumor primário (9,09) *versus* a média de perdas nas metástases nos linfonodos sentinela (3,52) = $t = 3,06$; $P < 0,01$; 2) média de ganhos no tumor primário *versus* a média de perdas no tumor primário (3,96) = $t = 2,80$; $P < 0,02$ e 3). Comparamos ainda as médias de ganho (7,61) e de perda nas metástases nos linfonodos sentinela que indicou um valor de $t = 2,64$; $P < 0,02$. Considerando este último resultado e os valores médios observados, é possível que as médias de ganhos nas metástases nos linfonodos sentinela e de perdas nos tumores primários também apresentem diferença estatisticamente significativa. No entanto, as mesmas observações não sugerem que haja diferenças estatisticamente significativas entre as médias de ganhos e entre as médias de perdas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.

Verificou-se também a homogeneidade da distribuição do total de aberrações cromossômicas (ganhos + perdas) nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 30 casos analisados (Tabelas 5 e 6). O teste do qui-quadrado apresentou um valor estatisticamente significativo ($\chi^2_{29}=57,50$; $P < 0,01$), indicando que, no total, as aberrações cromossômicas não se distribuíram homogeneamente nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 30 casos analisados. Observou-se que os maiores valores dos qui-quadrados parciais ocorreram nos casos 1, 18, 21, 25, 29 e 30, totalizando um valor de $\chi^2=35,17$, o que representou 61% do valor do χ^2 total. Portanto, a significância observada foi devida principalmente a estes seis casos.

A mesma análise, realizada para cromossomos (Tabelas 7 e 8) apresentou um valor de $\chi^2_{22}=11,31$; $P > 0,95$, estatisticamente não significativo, indicando que no total (ganhos + perdas) as aberrações cromossômicas se distribuíram homogeneamente nos 23 cromossomos analisados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.

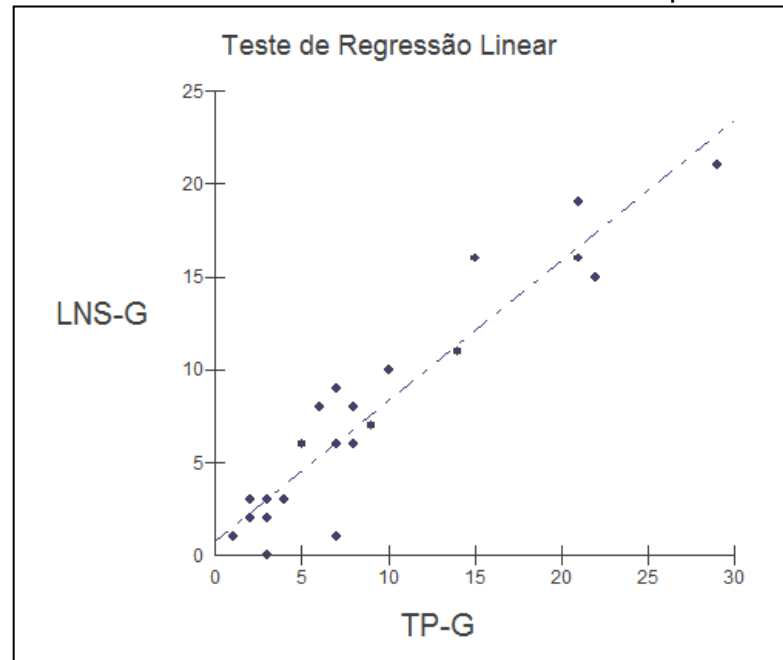
Os resultados dos testes do qui-quadrado, acima apresentados, foram melhor definidos ao aplicarmos a análise do coeficiente de regressão, considerando os números de ganhos, de perdas, e de ganhos + perdas de alterações cromossômicas, observados nos 30 casos de tumores primários e de metástases nos linfonodos sentinela e nos 23 cromossomos analisados. Este teste foi utilizado considerando que o tumor primário é o primeiro evento cancerígeno e, portanto, que as metástases nos linfonodos sentinela são um evento consequente, dependendo deste primeiro evento.

Para os **casos**, os resultados demonstraram que tanto para ganhos ($b=0,31$. $t = 1,92$; $P>0,05$), como para perdas ($b=0,17$. $t = 1,38$; $P>0,10$), e ainda para ganhos+perdas ($b=0,30$. $t = 2,03$; $P>0,05$), os valores de b não foram estatisticamente significativos, indicando que os números de aberrações cromossômicas observados nas metástases nos linfonodos sentinela não dependem dos números de aberrações cromossômicas detectados nos tumores primários.

Já para **cromossomos**, os resultados do coeficiente de regressão foram os seguintes: ganhos: $b=0,76$. $t = 13,15$; $P<0,001$, perdas: $b=0,91$. $t = 10,78$; $P<0,001$ e ganhos + perdas: $b=0,77$. $t = 10,17$; $P<0,001$ indicando, portanto, que quando se considera as aberrações por cromossomo, os números das mesmas observados nas metástases nos linfonodos sentinela dependem dos identificados no tumor primário. Estes resultados, estando de acordo, melhor quantificam os resultados dos testes do qui-quadrado, já que nos 30 casos observou-se que os números de aberrações cromossômicas não estavam homoganeamente distribuídos nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela, enquanto que nos cromossomos os mesmos estavam homoganeamente distribuídos.

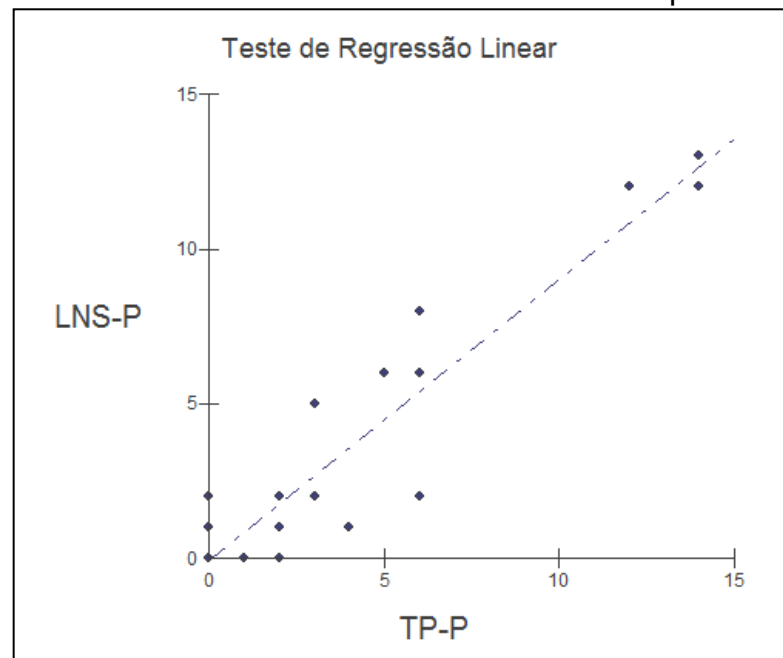
Os gráficos 7, 8 e 9 apresentam a distribuição dos números de aberrações cromossômicas e retas de regressão para cromossomos, respectivamente para ganhos, perdas e ganhos+perdas.

Gráfico 7: Diagrama de distribuição do número de ganhos e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



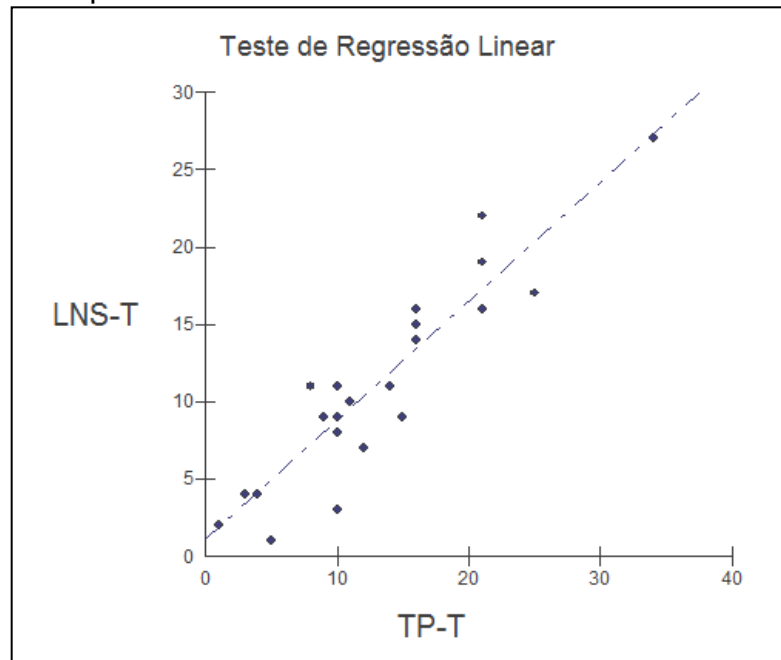
TP-G: número de ganhos em tumores primários; LNS-G: número de ganhos em metástases nos linfonodos sentinela.

Gráfico 8: Diagrama de distribuição do número de perdas e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



TP-P: número de perdas em tumores primários; LNS-P: número de perdas em metástases nos linfonodos sentinela.

Gráfico 9: Diagrama de distribuição do número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



TP-T: número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) em tumores primários; LNS-T: número total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) em metástases nos linfonodos sentinela.

Foi observado ainda, que 26 dos 30 casos estudados (86,7%) apresentaram alterações cromossômicas compartilhadas (Tabela 11), ou seja, que estão presentes tanto em tumores primários quanto nas metástases nos linfonodos sentinela do mesmo caso. Do total de 132 alterações compartilhadas, o caso 23 foi o que as apresentou em maior número (16 – 12,1%), seguido pelos casos 7, 11 e 13, com 11 alterações compartilhadas cada (8,3%).

Das 556 alterações cromossômicas, 424 (76,3%) foram não compartilhadas, ou seja, que não estiveram presentes simultaneamente em amostras de tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela do mesmo paciente. Os casos que apresentaram uma frequência maior de alterações cromossômicas compartilhadas do que de não compartilhadas foram os casos 7, 11, 15, 26 e 28. Os casos 7 e 11 apresentaram 11 alterações compartilhadas, os casos 15 e 26 apresentaram 7 e o caso 28 apresentou 6. O caso 12 apresentou a mesma frequência de alterações cromossômicas compartilhadas e não compartilhadas (4 de cada), enquanto que os demais casos apresentaram frequência menor de alterações

compartilhadas. Apenas 4 dos 30 casos (13,3%) (casos 1, 4, 9 e 20) não apresentaram nenhuma alteração cromossômica compartilhada.

Tabela 11: Alterações compartilhadas entre os tumores primários e as metástases nos linfonodos sentinela.

Par	Alterações compartilhadas
1	-
2	+1pter~p33, +22
3	+4p13~p12, +5q11~q21
4	-
5	+6pter~p21.1, +16p13.2~q23, +19, +22q11.1~q13.2
6	+1q, +4p16~q25, +10p13~p11.2, +11p, -11q23~qter, +21q
7	+1pter~p33, +5p, +6p, -6q, +8q24~qter, +16, +17p12~qter, -18q12~q22, +19, ++20q, +22
8	+1pter~p32, +9q, +16q11.2~q24, +18p11.31~p11.1, +19, +Xp11.2~q27
9	-
10	+13q21~q33
11*	+1pter~p32, -2q22,q36, -4q, -6q13~q23, ++9q21~qter, -13q13~q32, +16, +17, +19, +20q, +22q
12*	+1pter~p32, -13q13~q32, +16p, +19
13*	+1pter~p33, -1p31~p21, +1q33~qter, -2q22~q34, -5q, +12q24.1~qter, +16, +17, +19, +20, -Xq21~qter
14*	-1pter~p21, +1q22~qter, -6q13~q23, +16, +20
15*	+1pter~p32, -6q13~q23, +16p, +17, ++19, +20, +22
16*	-6q13~q23, -18q21~qter, +19, +Xq13~q22
17*	+22q
18*	+1pter~p31, +18p, +22
19*	-5q14~q23, -6q13~q23, +19, +21q, +22q, -Xp22.1~p11.4, -Xq21~q26
20*	-
21*	+1pter~p31, +19p
22*	+20q13
23*	-2q22~q34, -6q13~q23, +8p21~p11.2, +9q31~qter, +11pter~p15, -11q14~q22, +12q23~qter, -13q13~q32, +14q24~qter, +16, +17, +19, ++20q, +21q, ++22, -Xq21~q26
24*	+16p, +18p, +19p, +20p
25*	+1p21~q24, +12q23~qter, +16
26*	+1q22~qter, +2q24~qter, +8q23~qter, +12q23~qter, -13q13~q32, -15q23~qter, -16q12~qter
27*	+1pter~p32, +17p, +19, +20, +22
28*	-2q22~q36, -6q13~q23, +11p15~q21, -13q13~q32, +16, +18p
29*	+19
30*	+19, +20p

*: amostras de Santos et al., 2008, nos Anexos

Nas figuras a seguir estão apresentados os perfis gerais de todas as alterações cromossômicas, em todos os casos, nos tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela, respectivamente. As caixas amarelas indicam as regiões mais comumente alteradas quando consideramos o grupo de tumores primários e o grupo de linfonodos sentinela.

Ao considerarmos em conjunto todos os TP e todos os LNS, observamos que existem várias regiões cromossômicas com alterações em comum. E que os dois grupos são muito similares quando consideramos as alterações mais freqüentes. Nos tumores primários foram observados, principalmente, ganhos em 1p, 1q, 9q, 11p, 12q, 16p, 17p, 17q, 18p, 19, 20, 21q e 22q, e perdas em 2q, 4q, 6q, 13q e Xq (Figura 3). Nas metástases nos linfonodos sentinela, as regiões com ganhos mais comuns foram observadas em 1p, 1q, 9q, 11q, 16p, 16q, 17p, 17q, 19, 20, 21q e 22q, e as regiões com perdas mais comuns observadas em 1p, 2q, 4q, 6q, 13q e Xq (Figura 4).

Na figura 5 está apresentado o perfil geral de CGH para todos os casos (TP + LNS), destacando as regiões mais comumente alteradas.

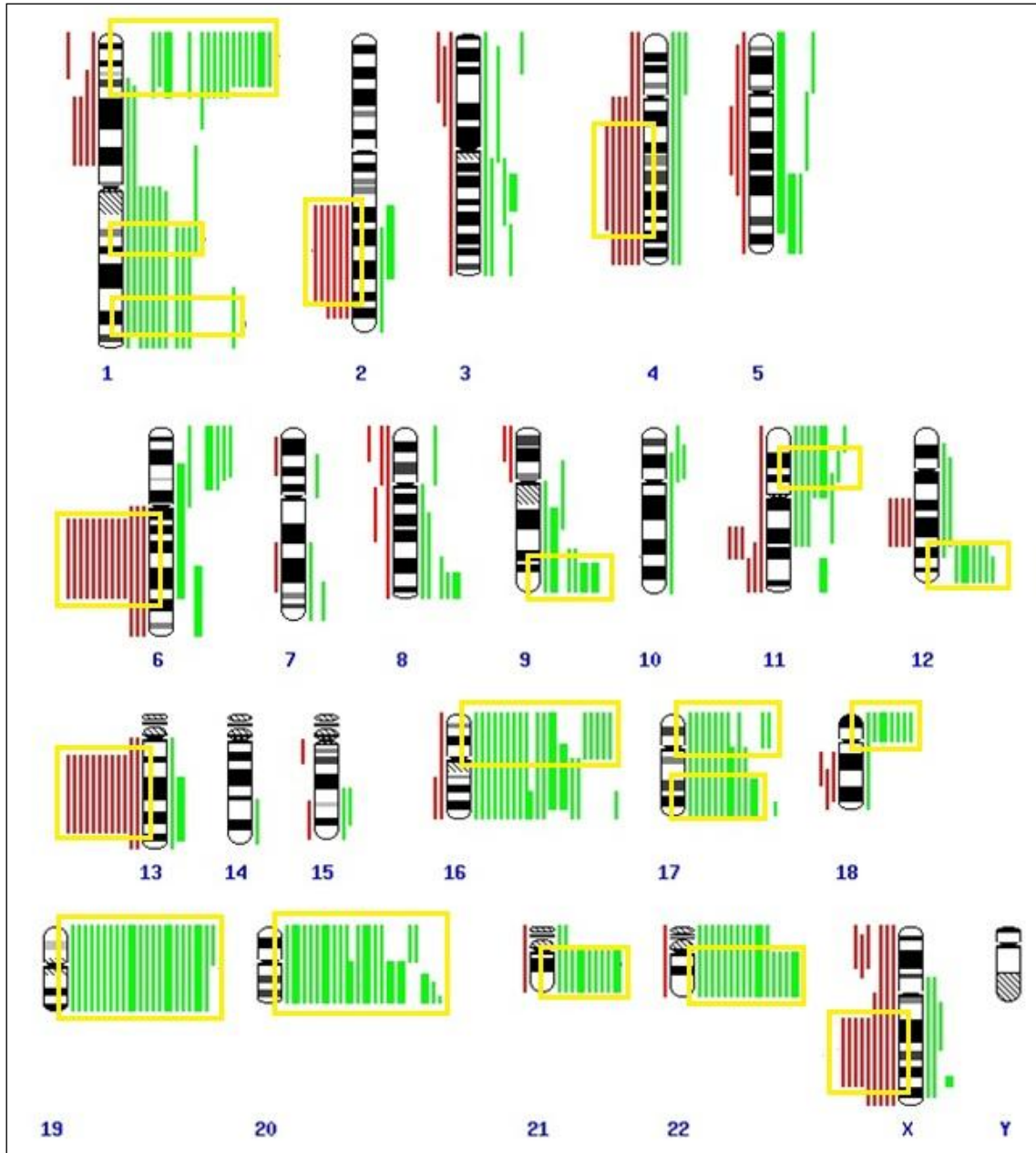


Figura 3: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em tumores primários. As barras verdes representam ganhos de regiões cromossômicas e casos separados, enquanto as barras vermelhas representam perdas. Barras mais espessas representam amplificações. As caixas amarelas indicam as regiões mais comumente alteradas.

Fonte: a autora (2011).

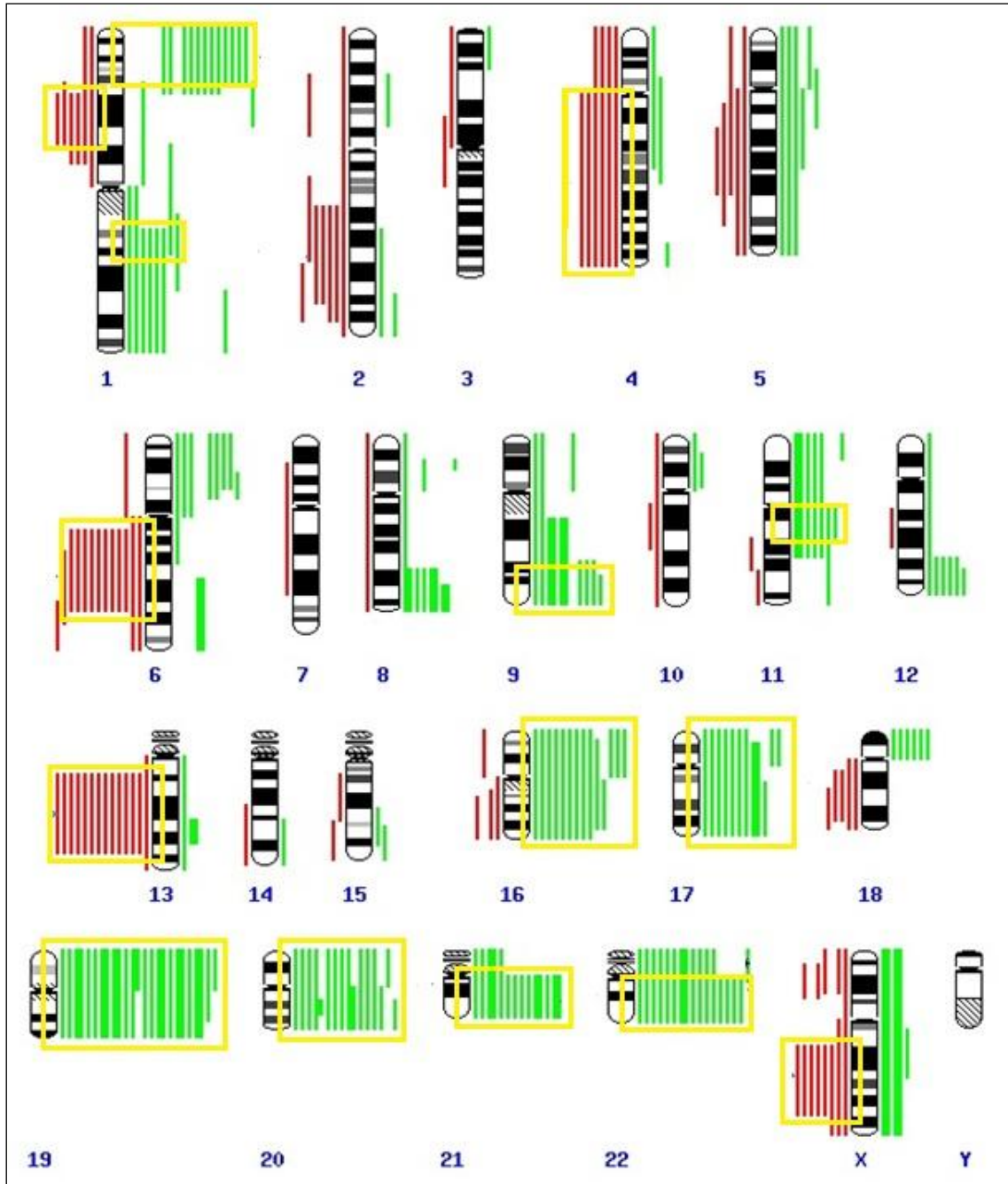


Figura 4: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em metástases nos linfonodos sentinela. As barras verdes representam ganhos de regiões cromossômicas e casos separados, enquanto as barras vermelhas representam perdas. Barras mais espessas representam ampliações. As caixas amarelas indicam as regiões mais comumente alteradas.

Fonte: a autora (2011).



Figura 5: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH, em todos os casos (TP + LNS). As barras verdes representam ganhos de regiões cromossômicas e casos separados, enquanto as barras vermelhas representam perdas. Barras mais espessas representam ampliações. As caixas amarelas indicam as regiões mais comumente alteradas.

Fonte: a autora (2011).

6.2.CGH-array

A técnica de CGH-array foi realizada em 10 casos dos 15 disponibilizados para esse estudo. Em todos os tumores primários analisados foram observadas alterações de número de cópias por este método. Nas metástases dos linfonodos sentinela apenas um caso não demonstrou alterações, no entanto estas estavam presentes na análise de seu tumor primário correspondente. Nas tabelas 12 e 13 estão apresentadas as alterações (amplificações e deleções) observadas nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela, respectivamente.

Tabela 12: Alterações cromossômicas observadas, por CGH-array, nos tumores primários.

		Casos										
C	R	1	4	5	6	7	11	12	13	14	15	
1	p36.33- p36.32							Amp				
	p36-32	Del						Amp				
	p36.32-p12	Del										
	p36.21		Amp									
	p36.13			Amp								
	p34.2			Amp								
	q21.1	Del										
	q21.2								Amp			
	q21.3								Amp			
	q22										Amp	
	q42.13			Amp								
2	p23.1		Del									
	q21.1			Amp								
3	p25.1-p11.2		Del									
	p22.1		Del								Amp	
	q26.31		Del									
4	p16.3							Amp	Amp			
	q12			Amp								
	q27			Amp								
	q31.23- q31.3					Amp						
5	q35.1										Amp	
	q35.3							Amp				
6	p25.1 - p24.3							Amp				
	p21.33			Amp								
	q12 – q27		Del									
	q13		Del								Amp	
	q24.2		Del	Amp								
7	p22.3							Amp				
	q11.23							Amp				
	q21.3					Amp				Amp		

8	p23.3 - p11.21	Del				
	p23.1	Del				
	p21.3	Del				Amp
	p11.21	Del	Amp			
	q11.1-q13.2	Del				
	q24.3		Amp	Amp		Amp
9	p13.1 - q13					Del
	q13-q21.11		Amp			
	q34.2 - q34.3					Amp
10	q26.3		Amp			Amp
11	p15.5 - p11.12	Del				
	p15.5-p15.4	Del	Amp			Amp
	q11-q13.1	Del				
	q12.2-q13.5					Amp
	q12.2	Del				Amp
	q12.3	Del				Amp
	q13.1-q13.4					Amp
	q13.1	Del	Amp		Amp	Amp
	q13.2-q25	Del				
	q13.2	Del	Amp		Amp	Amp
	q13.3	Del	Amp		Amp	Amp
	q13.4	Del	Amp		Amp	Amp
	q13.5	Del	Amp		Amp	
	q14.1	Del				
	q14.2-q14.3	Del				Amp
12	p11.21					Amp
	q24.22		Amp			Amp
13	q13.3		Amp			
	q14.3 - q31.1					
	q32.1					Amp
14	q21.1				Amp	Amp
	q32.33					Amp
15	q22.31					Amp
	q24.2					Amp
16	p13.3					Amp
	p11.2					Amp
	q24.2 - q24.3					Amp
17	p13.1					Amp
	q11.2		Amp			
	q12- q21.1				Amp	Amp
	q21.2				Amp	
	q21.32- q21.33	Del			Amp	
	q22	Del				
	q25.1-q25.3		Amp			Amp
18						
19	p13.3					Amp
	p13.2		Amp			

	q13.32	Amp	
	q13.42		Amp
	q13.43		Amp
20	q13.31		Amp
	q13.33	Amp	Amp
21	p11.1	Del	
	q11.2 - q22.3	Del	
	q22.3		Amp
22	q11.21		Amp
	q12.3		Amp
	q13.1	Amp	
	q13.33		Amp
X	p22.33 - p11.21	Del	
	q11.1 - q28	Del	
	q13.1	Del	Amp
	q26.1	Del	Amp
	q28		Amp

C: cromossomos, R: região cromossômica, Amp: amplificação, Del: deleção. As alterações em cinza, nos casos, representam apenas uma alteração ou estão contidas dentro do intervalo da região cromossômica anterior.

Tabela 13: Alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, nas metástases dos linfonodos sentinela.

		Casos									
C	R	1	4	5	6	7	11	12	13	14	15
1	p36.21		Amp		Del						
	p36.22			Amp							
	p36.13			Amp							
	p34.2			Amp							
	q21.1-q25.3				Del						
	q25.2				Amp						
	q25.3-q44				Del						
	q31.3			Amp	Del						
	q42.13			Amp	Del						Amp
	q42.3			Amp	Del						
2	p23.1										Amp
	q14.2				Amp						
	q21.1			Amp							
	q35										Amp
3	p25.2		Del								
	q26.31		Del		Amp						
4	q12			Amp							
5	p15.33			Amp							
	p15.31-p11				Del						
	p15.2			Amp	Del						
	q11.2-q35.2				Del						
	q32		Del		Amp						
6	p22.2-p22.1							Amp			
	p22.2			Amp				Amp			
	p21.33			Amp							
	p21.2				Amp						
	q24.2			Amp							
7	p22.3-p22.1			Amp							
	q36.3			Amp							
8	p23.3 - p11.21				Amp						
	p21.1			Amp							
	q11.1 - q24.3				Amp						
	q24.3			Amp	Amp						
9	q13-q21.11			Amp							
	q34.13 - q34.3				Amp						
	q34.2			Amp	Amp						
10	q26.3			Amp							
11	p15.5-p15.4										Amp
	p15.5			Amp							Amp
	p15.4 - p11.2				Del						
	p15.4			Amp	Del						Amp
	q11 - q12.3				Amp						
	q13.1 - q13.3				Del						
q13.4				Amp							

	q13.4 - q14.1			Del	
	q14.1 - q25			Amp	
	q14.3				Amp
12	q13.13			Amp	
	q13.3			Amp	
	q15			Amp	
	q24.22			Amp	
13	q13.3			Amp	
14	q21.1				Amp
	q21.3			Amp	
	q32.33		Del		
15					
16	p13.3 – p11.2			Del	
	p13.3	Del	Amp	Del	
	p11.2			Amp	
	q11.2 - q12.1			Del	
	q12.1 - q24.3			Amp	
	q24.2-q24.3			Amp	Amp
	q24.3	Del	Amp	Amp	
17	q12-q21.1				Amp
	q12			Amp	Amp
	q21.32- q21.33				Amp
	q21.32			Amp	Amp
	q23.3			Amp	Amp
	q25.1-q25.3			Amp	
18	q21.1			Amp	Amp
19	p13.3-p13.11			Amp	
	p13.2			Amp	
	q13.32			Amp	
20	q13.12				Amp
	q13.31 - q13.32				Del
	q13.33			Amp	Amp
21	q22.3			Amp	Amp
22	q11.21			Amp	
	q12.3				Amp
	q13.1			Amp	
X	p11.23			Amp	
	q13.1	Amp	Amp		Amp

C: cromossomos, R: região cromossômica, Amp: amplificação, Del: deleção. As alterações em cinza, nos casos, representam apenas uma alteração ou estão contidas dentro do intervalo da região cromossômica anterior.

Os resultados das alterações cromossômicas **por caso** são mostrados na tabela 14. Na Tabela 14A estão as frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas por caso, nos 10 tumores primários. Foram observadas 93 alterações cromossômicas, com uma média de $9,30 \pm 8,11$ alterações por caso. As amplificações (76) foram mais frequentes do que as deleções (17) ($\chi^2_1=37,4$; $P<0,001$ de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $7,60 \pm 8,72$ e $1,70 \pm 3,74$, respectivamente. Observou-se que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_9 = 63,67$; $P<0,001$), sendo que os casos 12 e 5 foram os que apresentaram um maior número de alterações cromossômicas, com 23 (24,7%, 23 amplificações e nenhuma deleção) e 21 (22,6%, 21 amplificações e nenhuma deleção), respectivamente. O caso 14 apresentou o menor número de alterações (1 amplificação, 1,1%).

Na tabela 14B estão as frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas nas metástases dos linfonodos sentinela por caso. Foi encontrado um total de 95 alterações cromossômicas, com um número médio de $9,50 \pm 13,93$ alterações por caso. As amplificações (78) foram mais frequentes do que as deleções (17) ($\chi^2_1=39,2$; $P<0,001$ de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $7,80 \pm 13,05$ e de $1,70 \pm 3,47$, respectivamente. Também para os linfonodos sentinela, as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso nos 10 linfonodos analisados ($\chi^2_9 = 183,84$; $P<0,001$). Os casos 5 (42 – 44,2%), com 42 amplificações e nenhuma deleção, e 6 (27 – 28,4%), com 17 amplificações e 10 deleções, apresentaram o maior número de alterações. Três casos, 1, 11 e 12, apresentaram apenas 1 alteração cromossômica (1,1%) e no caso 14 não foram observadas alterações.

Nos gráficos 10 a 12 estão a distribuição do número de ganhos, de perdas e do total de alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela nos 10 casos, respectivamente.

Tabela 14: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, por caso em tumores primários (A) e em metástases nos linfonodos sentinela (B).

A

C	1		4		5		6		7		11		12		13		14		15		Total	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	0	3	1	12	21	0	2	1	4	0	3	0	23	0	6	1	1	0	15	0	76	17
%	0,0	17,6	1,3	70,6	27,6	0,0	2,6	5,9	5,3	0,0	3,9	0,0	30,2	0,0	7,9	5,9	1,3	0,0	19,7	0,0	81,7	18,3
TG	3		13		21		3		4		3		23		7		1		15		93	
%	3,2		14,0		22,6		3,2		4,3		3,2		24,7		7,5		1,1		16,1			

C: Caso; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; A: Amplificações; D: Deleções

B

C	1		4		5		6		7		11		12		13		14		15		Total	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	1	0	2	6	42	0	17	10	3	0	1	0	1	0	3	1	0	0	8	0	78	17
%	1,3	0,0	2,6	35,3	53,8	0,0	21,8	58,8	3,8	0,0	1,3	0,0	1,3	0,0	3,8	5,9	0,0	0,0	10,3	0,0	82,1	17,9
TG	1		8		42		27		3		1		1		4		0		8		95	
%	1,1		8,4		44,2		28,4		3,2		1,1		1,1		4,2		0,0		8,4			

C: Caso; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; A: Amplificações; D: Deleções

Gráfico 10: Número de amplificações, observadas por CGH-array, por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

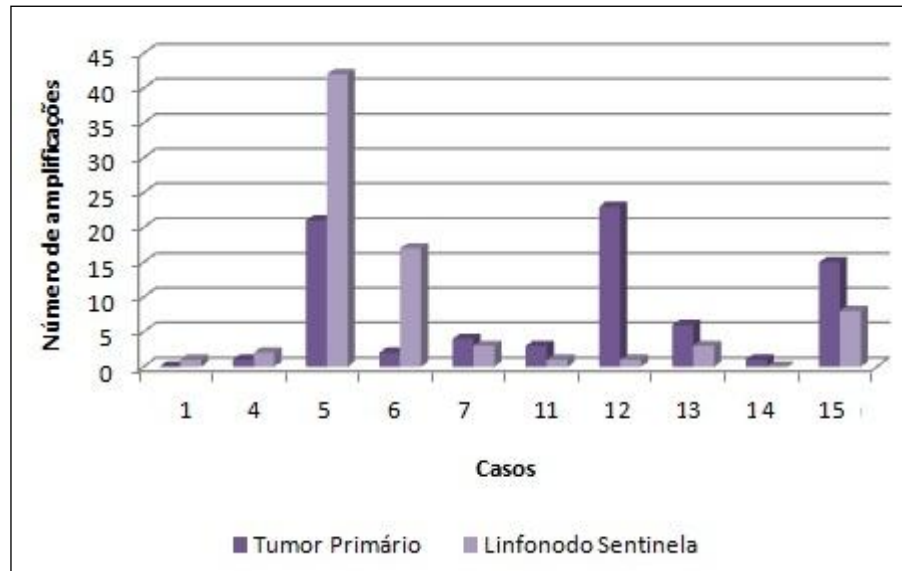


Gráfico 11: Número de deleções, observadas por CGH-array, por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

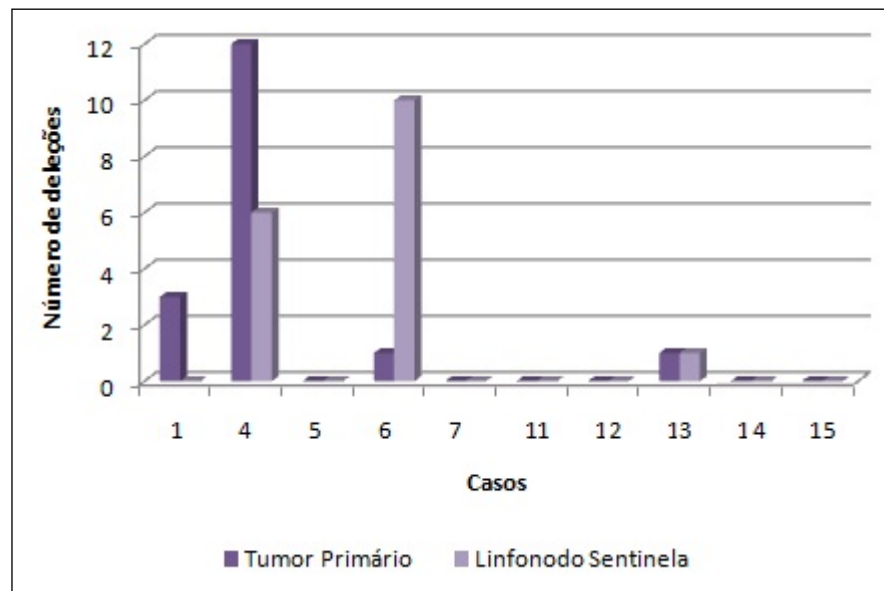
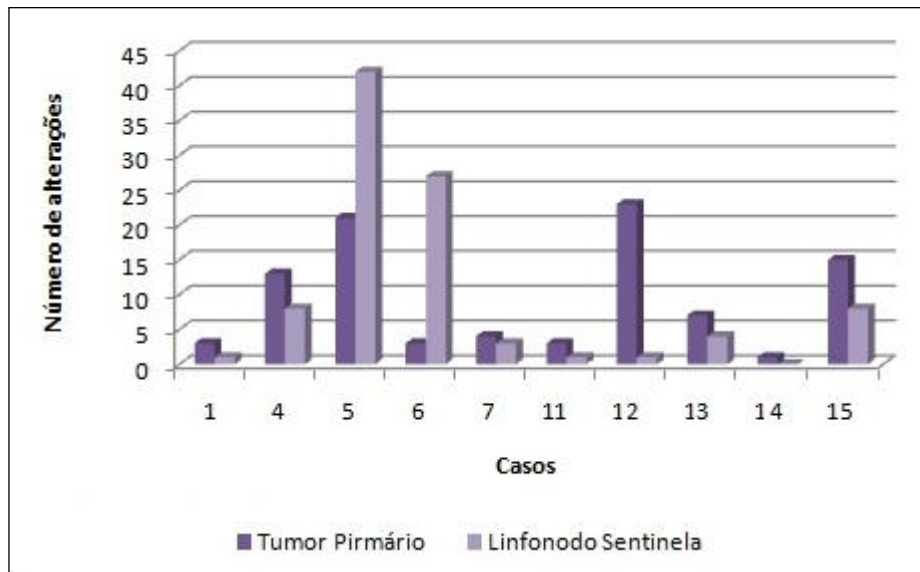


Gráfico 12: Número total de alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, por caso, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.



Nas tabelas a seguir estão apresentados os resultados referentes às alterações cromossômicas distribuídas **por cromossomo**. Na tabela 15 estão as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em tumores primários por cromossomo. Observou-se que as 93 alterações encontradas nos tumores primários (média de $4,04 \pm 2,48$ alterações por cromossomo) se distribuíram ao acaso nos cromossomos estudados ($\chi^2_{22}=33,42; P>0,05$), embora muito próximo do limite de significância ($=33,92$). Os cromossomos com maior número de alterações foram o 1 com 8 amplificações e 2 deleções (10 – 10,5%), 11 com 6 amplificações e 3 deleções (9 – 9,5%), e 17 com 7 amplificações e 1 deleção (8 – 8,4%), sendo que esses também foram os que apresentaram o maior número de amplificações (10,5%, 7,9%, e 9,2%, respectivamente). Os cromossomos com menor número de alterações foram o 2, 5, 10, 12, 13 e 15, com 2 alterações cada (2,1%), e o cromossomo 18 não apresentou alterações. O maior número de deleções ocorreu no cromossomo 11 (3 – 17,6%). O número médio de amplificações foi igual a $3,30 \pm 2,03$ e o de deleções foi igual a $0,74 \pm 0,97$.

Na tabela 16 estão as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em metástases nos linfonodos sentinela distribuídas por cromossomo. O número médio das alterações observadas foi de $4,13 \pm 2,96$ altera-

Tabela 15: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em tumores primários por cromossomo.

CR	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	8	2	1	1	1	2	5	0	2	0	4	1	4	0	5	2	2	1	2	0	6	3	2	0
%	10,5	11,8	1,3	5,9	1,3	11,8	6,6	0,0	2,6	0,0	5,3	5,9	5,3	0,0	6,6	11,8	2,6	5,9	2,6	0,0	7,9	17,6	2,6	0,0
TG	10	2	3	5	2	5	4	7	3	2	9	2												
%	10,8	2,2	3,2	5,4	2,2	5,4	4,3	7,5	3,2	2,2	9,7	2,2												

Continua

Continuação

CR	13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		X		Total	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	2	0	3	0	2	0	4	0	7	1	0	0	5	0	3	0	1	2	4	0	3	2	76	17
%	2,6	0,0	3,9	0,0	2,6	0,0	5,3	0,0	9,2	5,9	0,0	0,0	6,6	0,0	3,9	0,0	1,3	11,8	5,3	0,0	3,9	11,8	81,7	18,3
TG	2	3	2	4	8	0	5	3	3	4	5	93												
%	2,2	3,2	2,2	4,3	8,6	0,0	5,4	3,2	3,2	4,3	5,4	93												

CR: Cromossomo; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; A: Amplificações; D: Deleções

Tabela 16: Frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em metástases dos linfonodos sentinela por cromossomo.

CR	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	9	3	4	0	1	2	1	0	3	3	5	0	2	0	5	0	3	0	1	0	7	3	4	0
%	11,5	17,6	5,1	0,0	1,3	11,8	1,3	0,0	3,8	17,6	6,4	0,0	2,6	0,0	6,4	0,0	3,8	0,0	1,3	0,0	9,0	17,6	5,1	0,0
TG	12		4		3		1		6		5		2		5		3		1		10		4	
%	12,6		4,2		3,2		1,1		6,3		5,3		2,1		5,3		3,2		1,1		10,5			

Continua

Continuação

CR	13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		X		Total	
F	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
TP	1	0	2	1	0	0	4	4	7	0	2	0	3	0	4	1	2	0	3	0	5	0	78	17
%	1,3	0,0	2,6	5,9	0,0	0,0	5,1	23,5	9,0	0,0	2,6	0,0	3,8	0,0	5,1	5,9	2,6	0,0	3,8	0,0	6,4	0,0	82,1	17,9
TG	1		3		0		8		7		2		3		5		2		3		5		95	
%	1,1		3,2		0,0		8,4		7,4		2,1		3,2		5,3		2,1		3,2		5,3			

CR: Cromossomo; F: Frequência; TP: Total Parcial; TG: Total Geral; A: Amplificações; D: Deleções

ções por cromossomo. Foi observado que a distribuição de alterações cromossômicas não ocorreu ao acaso entre os cromossomos ($\chi^2_{22}=46,63;P<0,01$).

O número médio de amplificações de DNA foi igual a $3,39 \pm 2,23$ e o de deleções foi igual a $0,74 \pm 1,29$. Os cromossomos com maior número de alterações foram os de número 1 com 9 amplificações e 3 deleções (12 – 12,6%), 11 com 7 amplificações e 3 deleções (10 – 9,5%), e 16 com 4 amplificações e 4 deleções (8 – 8,4%). Os cromossomos com menor número de alterações foram o 4, 10 e 13, com apenas 1 alteração (1,1%). O cromossomo 1 apresentou o maior número de amplificações cromossômicas (9 – 11,5%), seguido pelos cromossomos 11 e 17, com 7 amplificações cada (9,0%). O maior número de deleções ocorreu no cromossomo 16 (4 – 23,5%), seguido pelos cromossomos 1, 5 e 11, com 3 deleções cada (17,6%). O cromossomo 15 não apresentou alterações cromossômicas.

Nos gráficos 13 a 15 estão, respectivamente, a distribuição do número de amplificações, deleções e do total de alterações cromossômicas observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 23 cromossomos.

Gráfico 13: Número de amplificações, observadas por CGH-array, por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

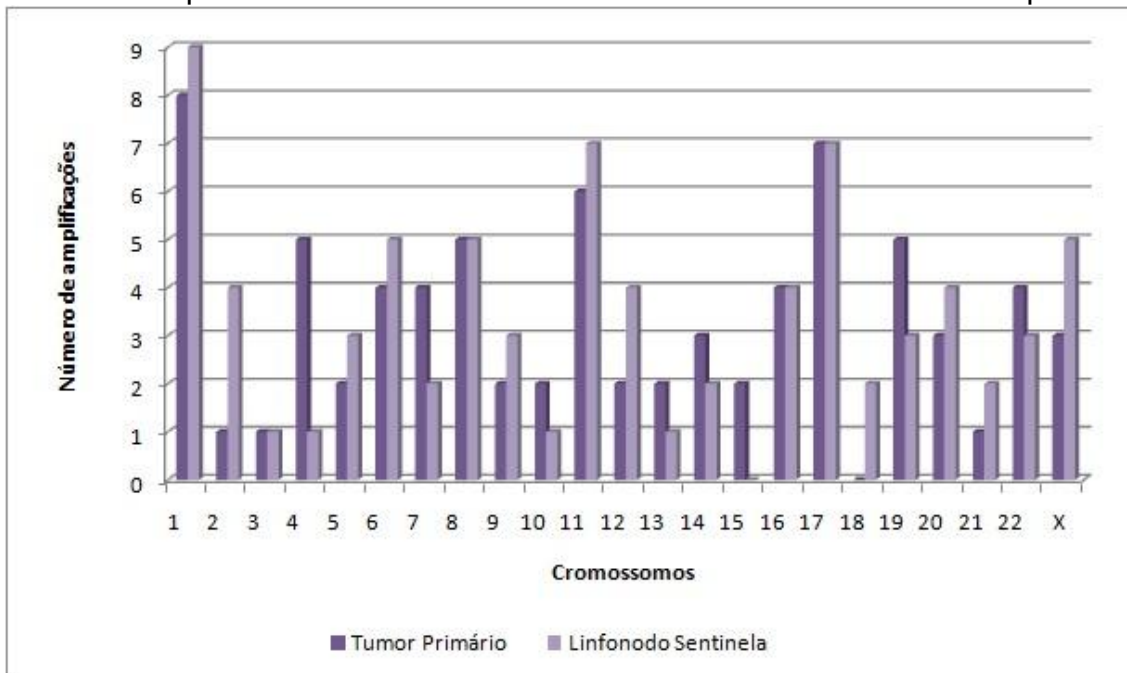


Gráfico 14: Número de deleções, observadas por CGH-array, por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.

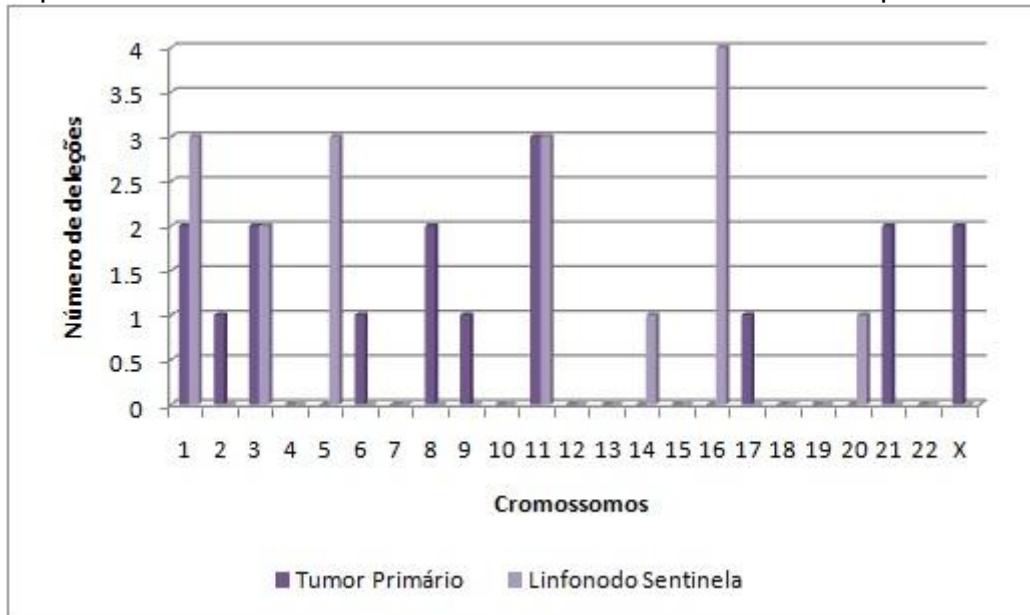
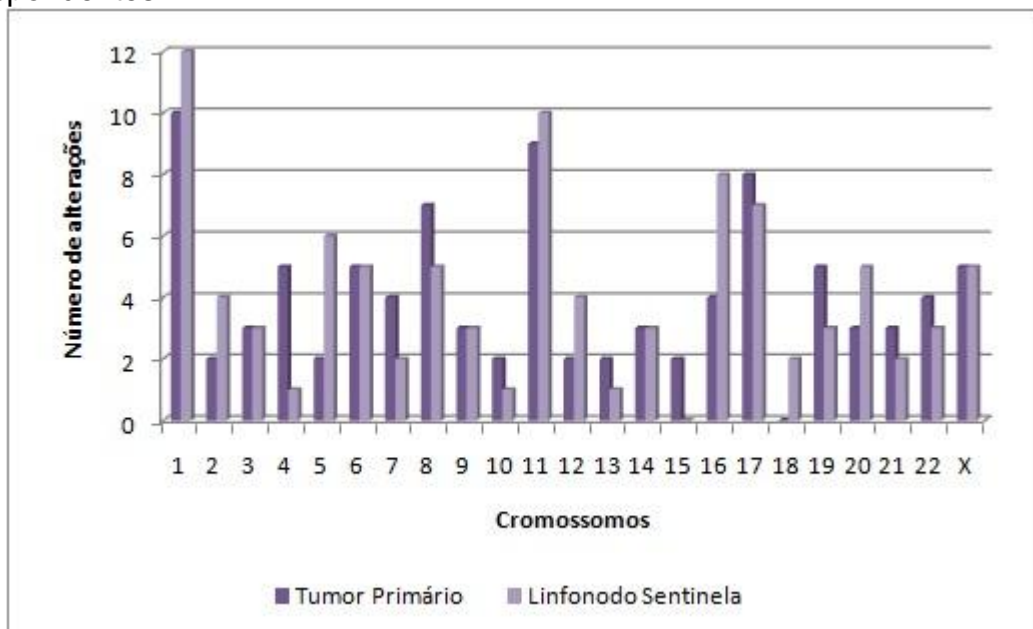


Gráfico 15: Número total de alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, por cromossomo, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela correspondentes.



Na tabela 17 estão resumidas as informações por caso e por cromossomo sobre as médias de ampliações e deleções de alterações cromossômicas, nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela analisados neste trabalho por CGH-array.

Tabela 17: Médias de amplificações (n= 76 e 73) e deleções (n=17 e 17) cromossômicas, observadas por CGH-array, por caso e por cromossomo nos tumores primários e nas metástases dos linfonodos sentinela, respectivamente.

TUMORES PRIMÁRIOS						
Alteração	Caso			Cromossomo		
	Amplificação	Deleção	Total	Amplificação	Deleção	Total
Média ± DP	7,60 ± 8,76	1,70 ± 3,74	9,30 ± 8,11	3,30 ± 2,03	0,74 ± 0,97	4,04 ± 2,48

Continua

Continuação

LINFONODOS SENTINELA						
Alteração	Caso			Cromossomo		
	Amplificação	Deleção	Total	Amplificação	Deleção	Total
Média ± DP	7,80 ± 13,05	1,70 ± 3,47	9,50 ± 13,93	3,39 ± 2,23	0,74 ± 1,29	4,13 ± 2,96

A estes dados foi aplicado o teste de Bartlett. Para **casos**, este teste indicou um valor de $\chi^2_{(3)\text{corr}}$ igual a 19,72; $P < 0,001$, demonstrando que os quadrados médios do número de alterações cromossômicas nos 10 casos analisados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela apresentam diferenças estatisticamente significativas. Como já nos referimos na apresentação dos dados obtidos por CGH, o valor estatisticamente significativo do teste de Bartlett inviabiliza a análise de variância desde que a condição *sine quo non* para aplicá-la é que não haja diferença significativa entre os quadrados médios dos dados amostrais. Desta forma, avaliamos a significância das diferenças entre as médias, através do teste *t* de *Student*. Como também já foi referido na apresentação dos dados obtidos por CGH, o rigor estatístico permite a comparação de somente três das quatro médias de alterações cromossômicas (amplificações e deleções).

Observa-se, na Tabela 17, que as médias para as amplificações nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela são muito semelhantes e para as deleções são de valores iguais. Assim, somente as diferenças entre as médias de amplificações e deleções, tanto dos tumores primários como das metástases nos linfonodos sentinela, foram avaliadas e os resultados não foram estatisticamente significantes ($t = 1,97; P > 0,05$ e $t = 1,43; P > 0,10$, respectivamente). Observa-se também, nos dados da Tabela 17, que os desvios padrão das médias apresentam um valor superior aos das médias (com exceção para o total de alterações nos TP). Constata-se também que as variâncias (obtida elevando-se o desvio padrão ao quadrado) das amostras de amplificações apresentam um valor muito superior do que as observadas nas amostras de deleções. Realmente, a razão (de amplificações x deleções) entre os valores de quatro delas (TPxTP; TPxLNS; LNSxLNS; LNSxTP), avaliada pelo *F* (de Fischer) indicou valores estatisticamente significativos. Estes dados indicam que há uma grande dispersão dos valores em torno da média. O mesmo não foi observado nas comparações entre as amplificações e entre as deleções das duas amostras.

Para **cromossomos**, o teste de Bartlett apresentou um valor de $\chi^2_{(3)\text{corr}}$ Igual a 18,54; $P < 0,001$, indicando que também para cromossomos os quadrados médios do número de alterações nos 23 cromossomos analisados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela apresentam diferenças estatisticamente significativas. Como nos casos, as médias de amplificações nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela são muito semelhantes e para deleções

são iguais , conforme pode ser observado na Tabela 17. Assim, seguimos o mesmo procedimento da análise anterior (para casos), comparando pelo teste *t* de Student a significância das diferenças entre as médias de ampliações e deleções tanto para TP como para LNS. Em ambas as comparações os resultados foram estatisticamente significantes ($t = 5,45; P < 0,001$ e $t = 4,91; P < 0,001$, para TP e LNS, respectivamente). Para cromossomos, os desvios padrão tiveram um valor superior aos das médias somente para as deleções, tanto em TP como em LNS, demonstrando uma maior consistência dos valores em torno das médias nas quatro outras amostras, provavelmente devido ao maior tamanho amostral do que o de casos.

Verificou-se também a homogeneidade da distribuição do total de alterações cromossômicas (amplificações + deleções nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 10 **casos** analisados – Tabela 14). O teste do qui-quadrado apresentou um valor estatisticamente significativo ($\chi^2_9=53,89; P < 0,001$) indicando que, no total, as alterações cromossômicas não se distribuíram homogeneamente nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 10 casos analisados. Observou-se que os maiores valores dos qui-quadrados parciais ocorreram nos casos 6 e 12 totalizando um valor de $\chi^2=39,54$, o que representou 73% do valor do χ^2 total. Portanto, a significância observada foi devida principalmente a estes dois casos.

A mesma análise, realizada para **cromossomos** (Tabelas 15 e 16) apresentou um valor de $\chi^2_{22}=17,25; P > 0,70$, estatisticamente não significativo, indicando que no total (amplificações + deleções) as alterações cromossômicas se distribuíram homogeneamente nos 23 cromossomos analisados nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.

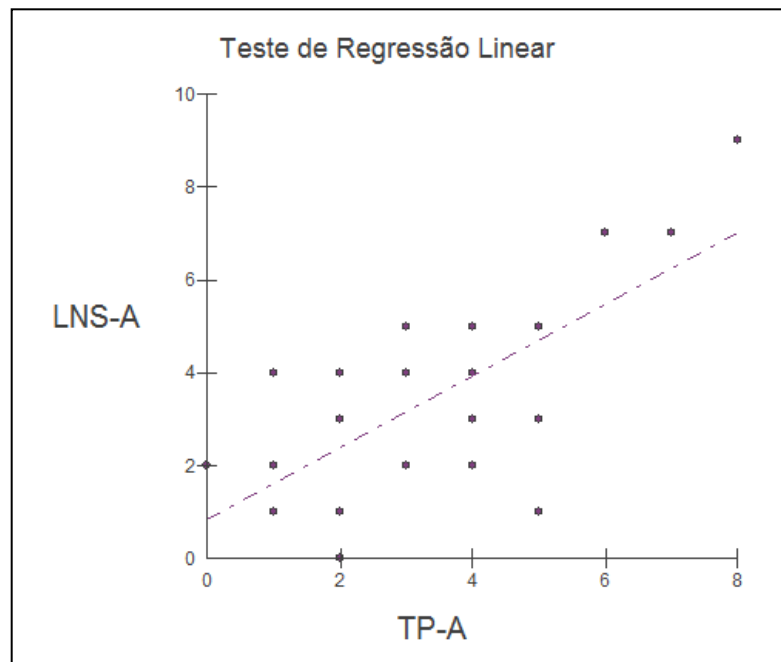
Os resultados dos testes do qui-quadrado, acima apresentados, foram melhor definidos, da mesma forma quando analisamos os dados de CGH, ao aplicarmos a análise do coeficiente de regressão, considerando o número de ampliações, de deleções e do total de alterações (amplificações + deleções) observadas nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela nos 10 casos e nos 23 cromossomos analisados . Considerou-se, para esta análise, que o tumor primário é o primeiro evento cancerígeno e, portanto, que as metástases nos linfonodos sentinela sendo um evento conseqüente, dependem deste primeiro evento.

Para casos, os resultados demonstraram que tanto para ampliações (b=0,73, t=1,59; P>0,10), como para deleções (b=0,42, t=1,48; P>0,10), e ainda para ampliações + deleções (b=0,63, t=1,11; P>0,30), os valores de b não foram estatisticamente significativos, indicando que os números de alterações cromossômicas observados nas metástases nos linfonodos sentinela não dependem dos números de alterações cromossômicas detectados nos tumores primários.

Já para cromossomos, os resultados foram os seguintes: ampliações: b=0,77, t=4,55; P<0,001, deleções: b=0,31, t=1,11; P>0,20, e ampliações + deleções: b=0,88, t=5,0; P<0,001, indicando, portanto, que com exceção para deleções, quando se considera as alterações por cromossomo, os números das mesmas observados nas metástases nos linfonodos sentinela dependem dos identificados no tumor primário. Estes resultados, estando de acordo (com exceção para deleções nos 23 cromossomos), melhor qualificam os resultados do qui-quadrado já que nos 10 casos os números de alterações cromossômicas não estavam homogeneamente distribuídos nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela, enquanto que nos cromossomos os mesmos estavam (exceção para deleções) homogeneamente distribuídos.

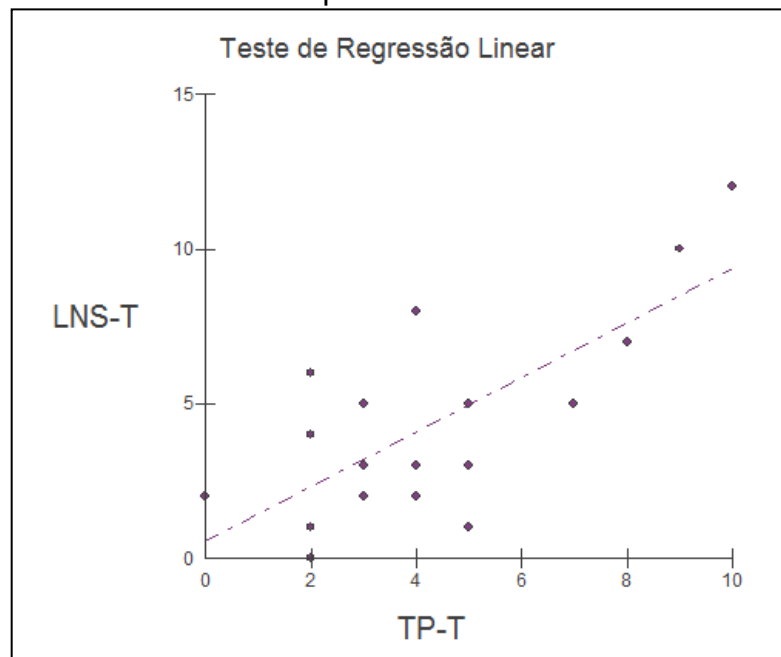
Nos gráficos 16 e 17 estão a distribuição dos números de alterações cromossômicas e retas de regressão para cromossomos, respectivamente para ampliações e ampliações + deleções, onde os valores de b foram significativos.

Gráfico 16: Diagrama de distribuição do número de ampliações e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



TP-A: número de ampliações em tumores primários; LNS-A: número de ampliações em metástases nos linfonodos sentinela.

Gráfico 17: Diagrama de distribuição do número total de alterações cromossômicas (amplificações + deleções) e reta de regressão em tumores primários e em metástases nos linfonodos sentinela por cromossomo.



TP-T: número total de alterações cromossômicas (amplificações + deleções) em tumores primários; LNS-T: número total de alterações cromossômicas (amplificações + deleções) em metástases nos linfonodos sentinela.

Observamos que, dos 10 casos estudados, 5 (50,0%) apresentaram alterações cromossômicas compartilhadas (Tabela 18), ou seja, que estão presentes tanto nos tumores primários quanto nas metástases nos linfonodos sentinela do mesmo caso. Do total de 28 alterações compartilhadas, o caso 5 foi o que as apresentou em maior número (19 – 67,9%).

Das 188 alterações cromossômicas observadas por CGH-array nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela, 160 (85,1%) foram não compartilhadas, ou seja, não estiveram presentes simultaneamente em amostras de tumores primários e nas metástases em linfonodos sentinela do mesmo paciente. Em todos os casos a frequência de alterações não-compartilhadas foi maior do que a de alterações compartilhadas.

Tabela 18: Alterações compartilhadas entre os tumores primários e as metástases nos linfonodos sentinela.

Par	Alterações compartilhadas	
	Amplificações	Deleções
1	-	-
4	1p36.21	3q26.31
5	1p36.13, 1p34.2, 1q42.13, 2q21.1, 4q12, 6p21.33, 6q24.2, 8q24.3, 9q13-q21.1, 10q26.3, 11p15.5, 11p15.4, 12q24.22, 13q13.3, 17q25.1-q25.3, 19p13.3, 19q13.32, 20q13.33, 22q13.1	-
6	8q24.3, 11q13.4	-
7	7q12-q21.1, 7q21.32-q21.33	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	11q14.3, 14q21.1, Xq13.1	-

Nas figuras a seguir estão apresentados os perfis gerais das alterações cromossômicas observadas por CGH-array, na amostra de tumores primários e na amostra das metástases nos linfonodos sentinela, respectivamente.

Ao considerarmos em conjunto todos os TP e todos os LNS, observamos que existem regiões cromossômicas com alterações em comum. As regiões cromossômicas mais comumente alteradas nos TP, nos LNS e em todos os casos (TP + LNS) estão apresentadas na tabela 19.

Nas figuras 6,7 e 8 estão os perfis gerais das alterações observadas por CGH-array para todos os TP, todos os LNS e todos os casos (TP + LNS), respectivamente.

Tabela 19: Regiões cromossômicas, observadas por CGH-array, mais comumente alteradas.

Amostra	Região Cromossômica
TP	8q24.3, 11p15.5-p15.4, 11q13.1-q13.4
LNS	1q42.13, 11p15.4, 16p13.3, 16q24.3, 20q13.33, Xq13.1
TP + LNS	1q21.1-q25.3, 8q24.3, 10q26.3, 11p15.5-p15.4, 11q13.1-q13.4, 14q21.1, 16p11.2, 17q12-q21, 17q25.1-q25.3, 20q13.33, 21q22.3, Xq13.1

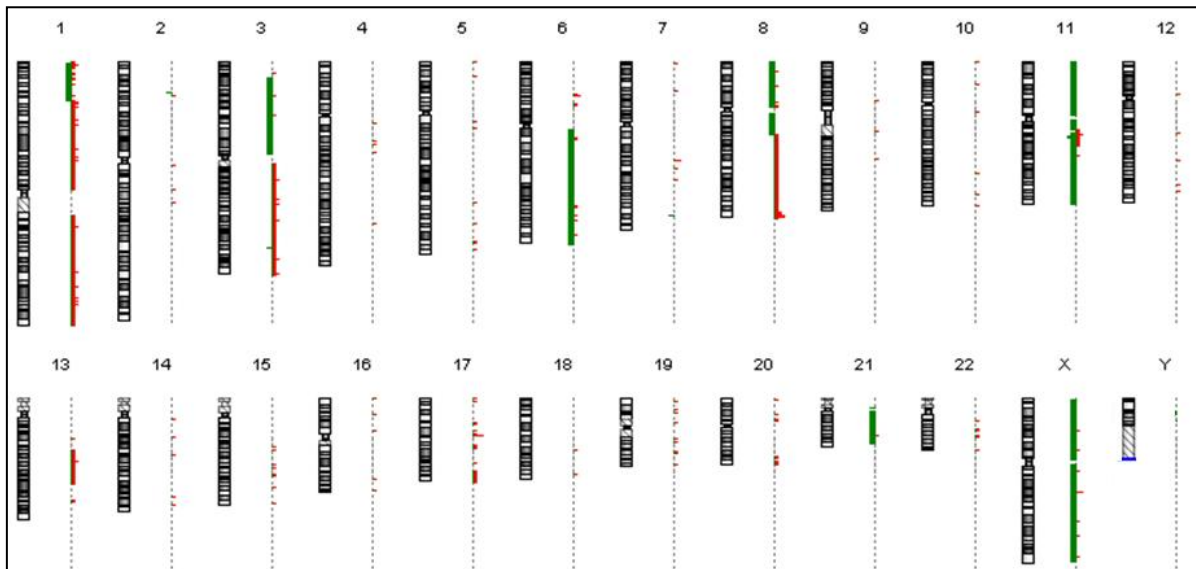


Figura 6: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em tumores primários. Em barras vermelhas estão representadas as amplificações e em verde as deleções de regiões cromossômicas.

Fonte: a autora (2011).

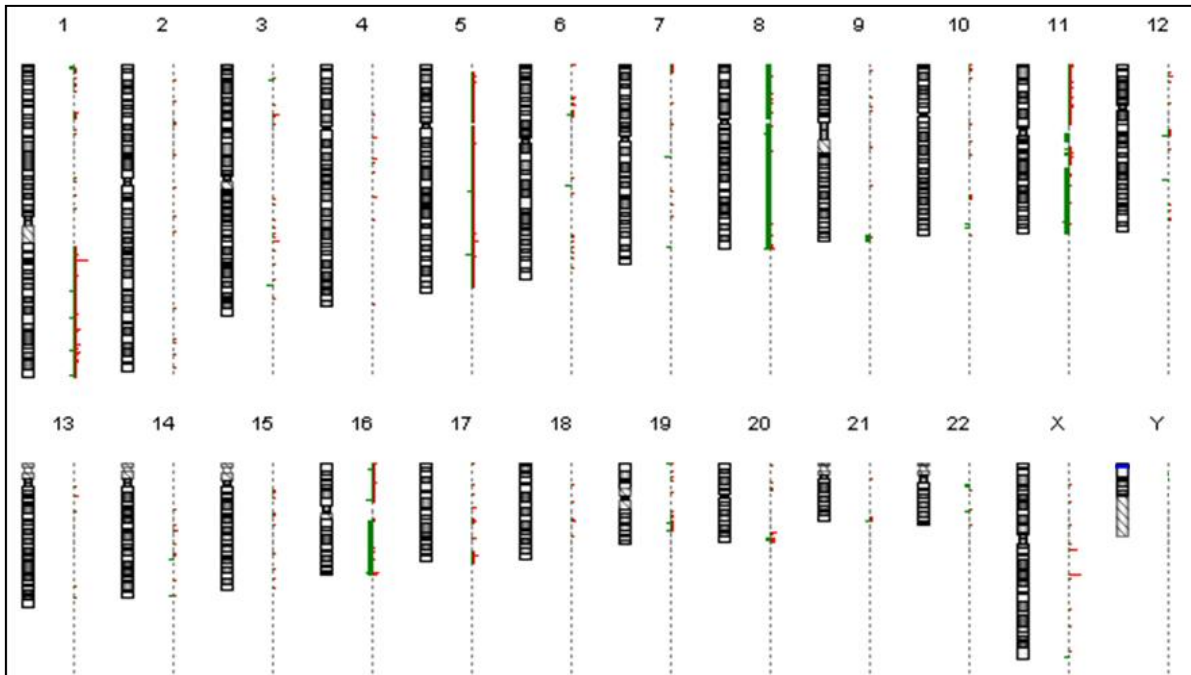


Figura 7: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em metástases nos linfonodos sentinela. Em barras vermelhas estão representadas as ampliações e em verde as deleções de regiões cromossômicas.
Fonte: a autora (2011).

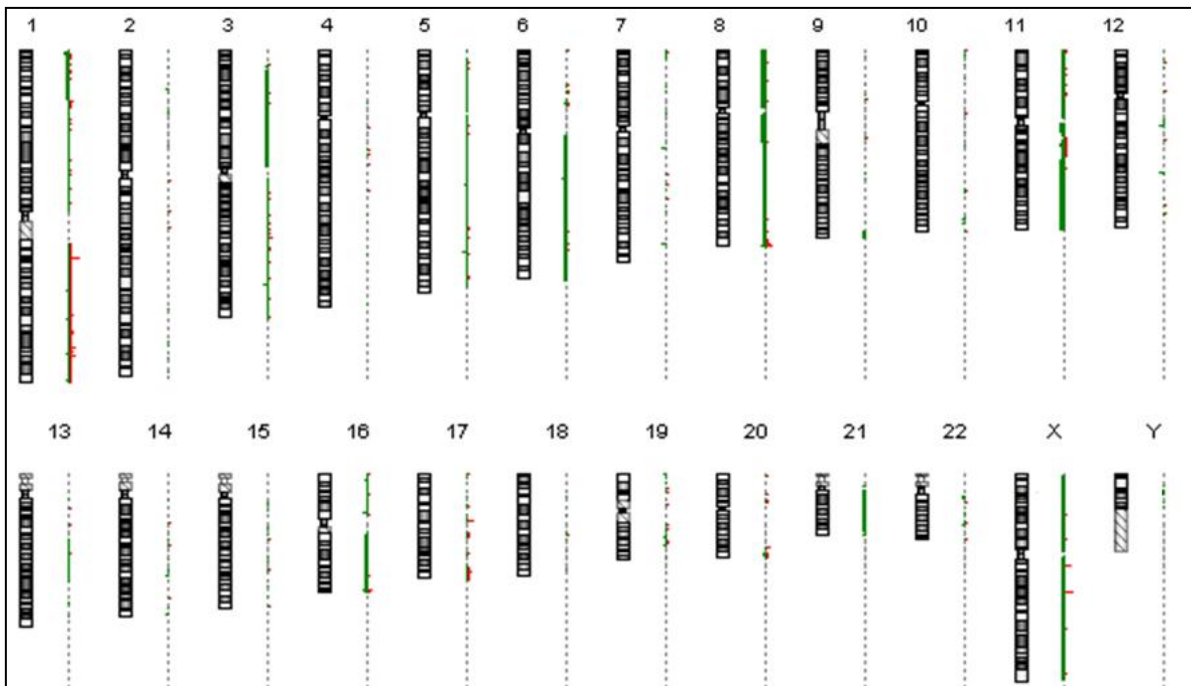


Figura 8: Perfil geral das alterações cromossômicas, observadas por CGH-array, em todas os casos (TP + LNS). Em barras vermelhas estão representadas as ampliações e em verde as deleções de regiões cromossômicas.
Fonte: a autora (2011).

6.2.1. Validação dos resultados de CGH-array em genes específicos

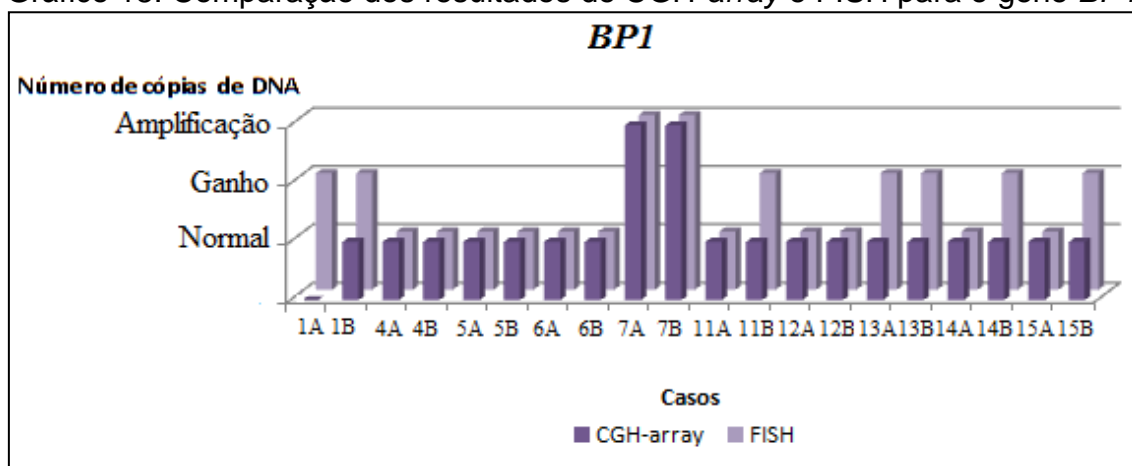
6.2.1.1. FISH

A técnica de FISH foi realizada para a validação das alterações do número de cópias obtidas por CGH-array para os genes *BP1* e *HER2*. Dez casos pareados foram analisados para estes genes, sendo que um mínimo de 100 núcleos interfásicos foram avaliados em cada experimento.

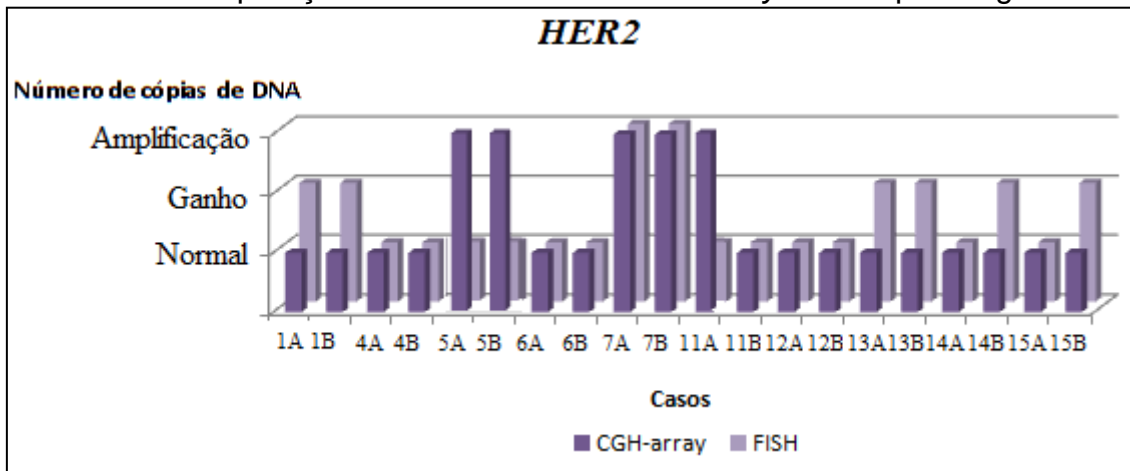
Para o gene *BP1*, os resultados foram concordantes entre as duas técnicas em 13 das 20 análises (65,0%). Em 7 (35,0%), o número de cópias do genes *BP1* não foi concordante entre o CGH-array e o FISH. Em relação ao gene *HER2*, a validação se mostrou concordante em 55% dos casos (11) e não concordante em 45% (9). Nos gráficos 18 e 19 estão apresentadas as comparações dos resultados das duas técnicas, para os dois genes avaliados.

Na figura 9 estão os resultados de dois TP em relação aos genes *BP1* e *HER2* pela técnica de CGH-array (A) e o resultado concordante de FISH para um dos TP (B), em que foi encontrada amplificação para os dois genes avaliados (*BP1* em verde e *HER2* em vermelho).

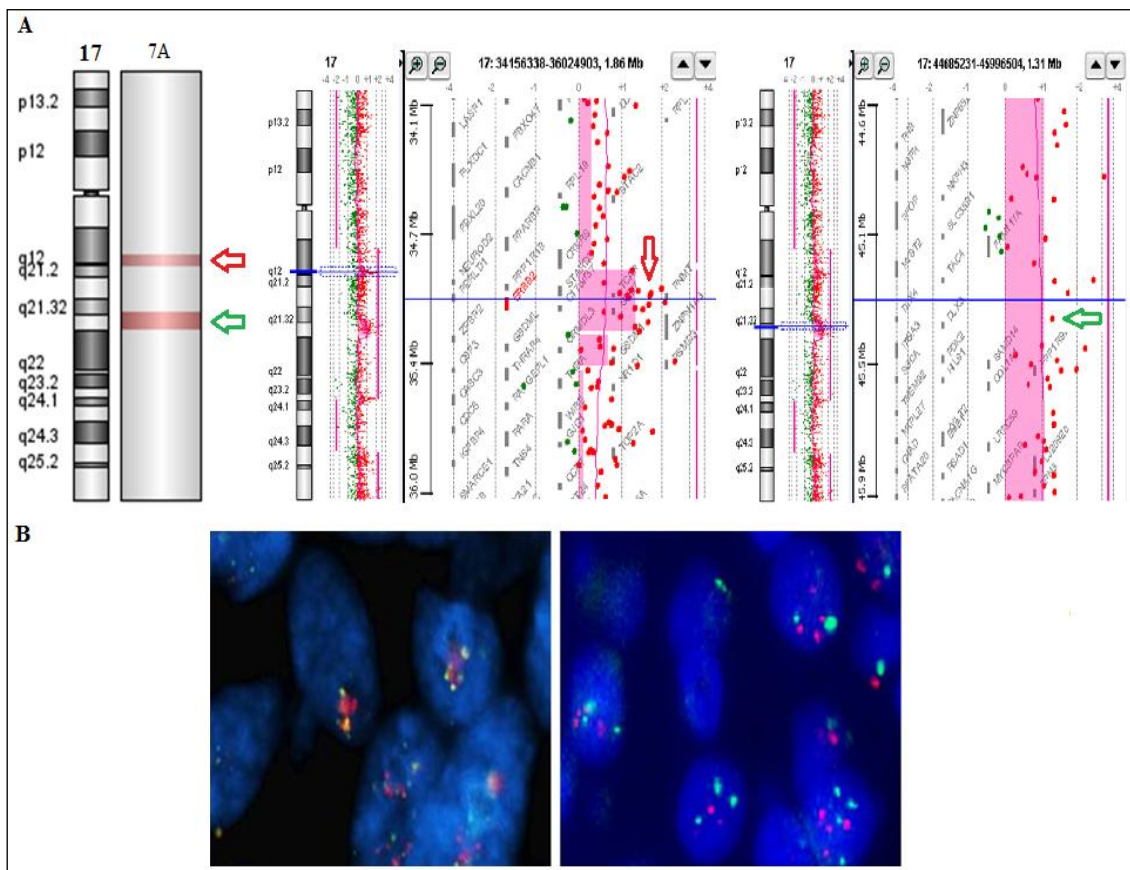
Gráfico 18: Comparação dos resultados de CGH-array e FISH para o gene *BP1*.



Nos casos, a letra A representa o tumor primário e a letra B a metástase no linfonodo sentinela correspondente.

Gráfico 19: Comparação dos resultados de CGH-array e FISH para o gene *HER2*.

Nos casos, a letra A representa o tumor primário e a letra B a metástase no linfonodo sentinela correspondente.

Figura 9: Avaliação dos genes *BP1* e *HER2* por CGH-array (A) e FISH (B).

A: resultados de CGH-array, mostrando a amplificação dos genes *BP1* (setas verdes) e *HER2* (setas vermelhas) no tumor primário 7A. **B:** análise de FISH do mesmo tumor primário, com amplificação dos genes *BP1* (sondas verdes) e *HER2* (sondas vermelhas).

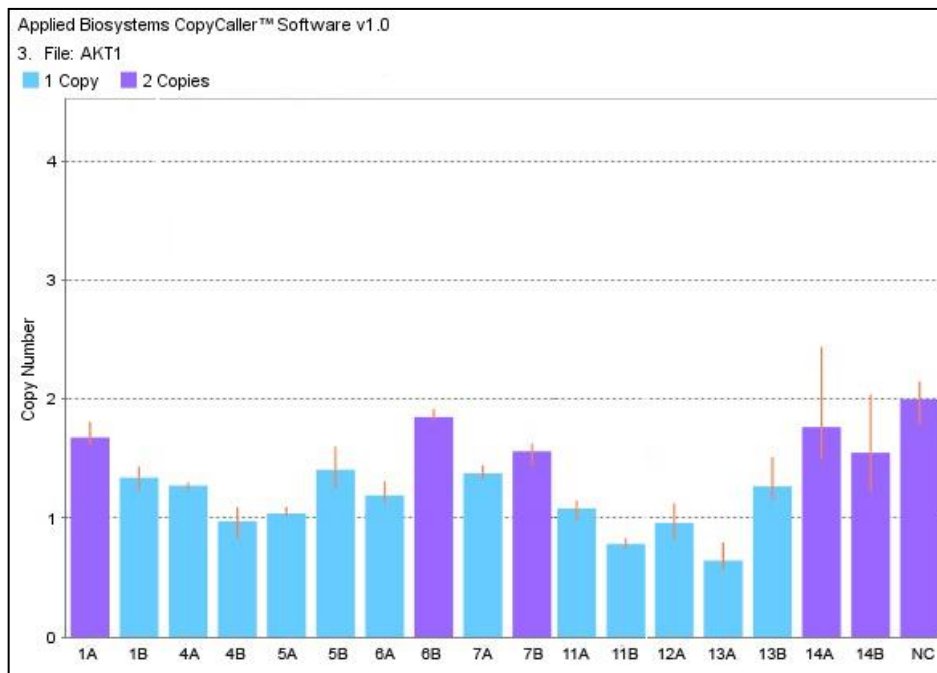
Fonte: a autora (2011).

6.2.1.2.PCR em tempo real

Os dados de CGH-*array* em relação ao número de cópias dos genes *AKT1*, *AKT2*, *BP1*, *FGFR2*, *HER2*, *PI3KCA* e *PTEN* foram validados através do sistema *TaqMan Copy Number Assay*. Esta validação foi possível em 9 dos 10 casos pareados analisados por CGH-*array* . No caso de número 15 não foram obtidos resultados na PCR em tempo real para nenhum dos genes acima avaliados.

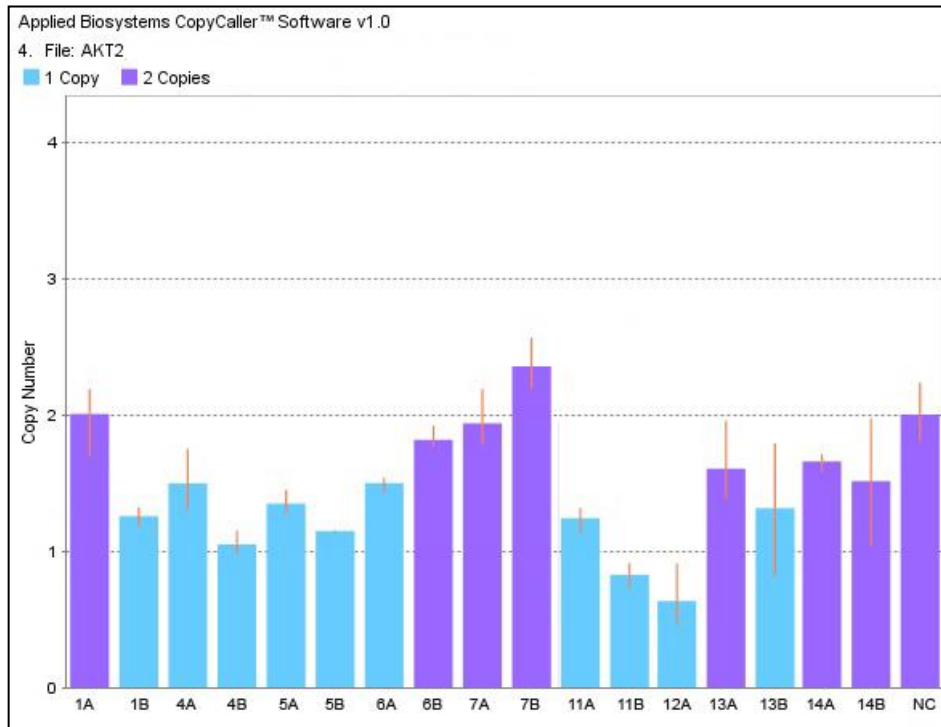
Nos gráficos a seguir estão apresentados os números de cópias de cada gene analisado por PCR em tempo real. A última amostra de cada gráfico (NC) representa o controle normal do experimento (amostra não tumoral).

Gráfico 20: Análise de número de cópias do gene *AKT1* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



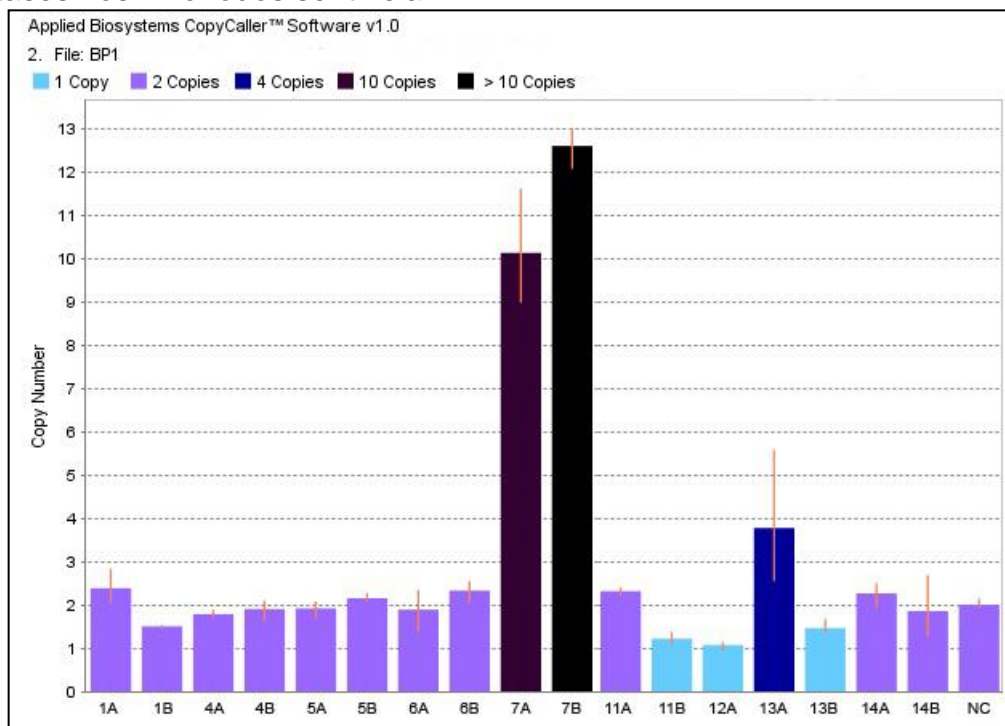
As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 21: Análise de número de cópias do gene *AKT2* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



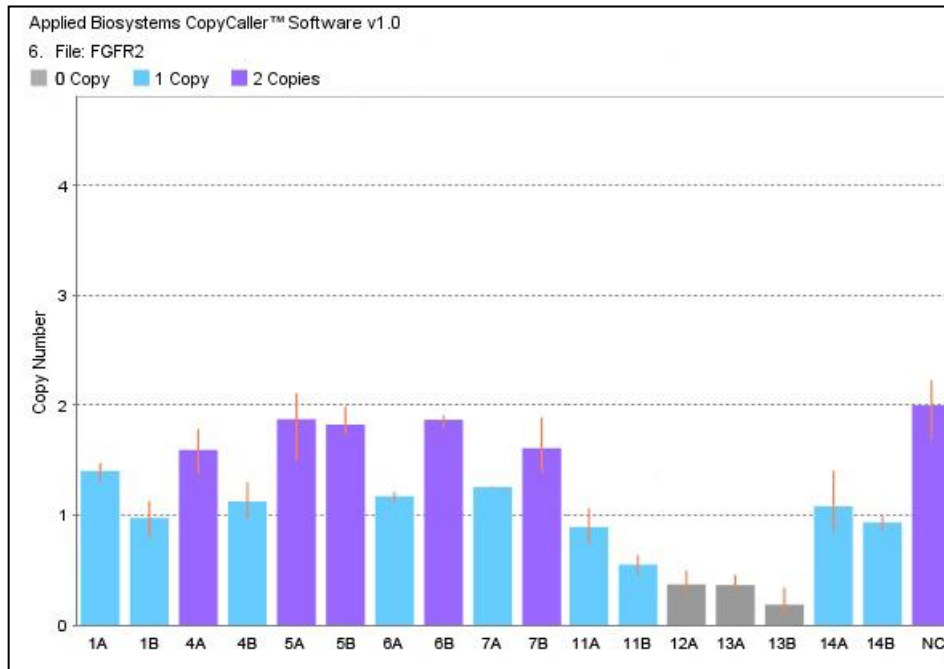
As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 22: Análise de número de cópias do gene *BP1* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



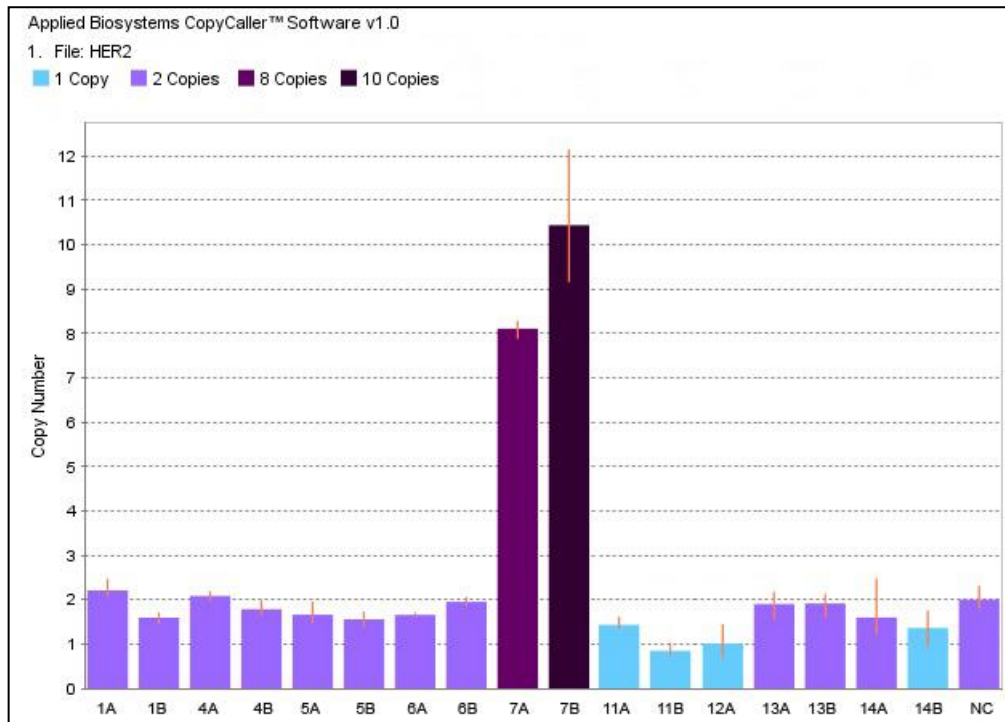
As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 23: Análise de número de cópias do gene *FGFR2* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



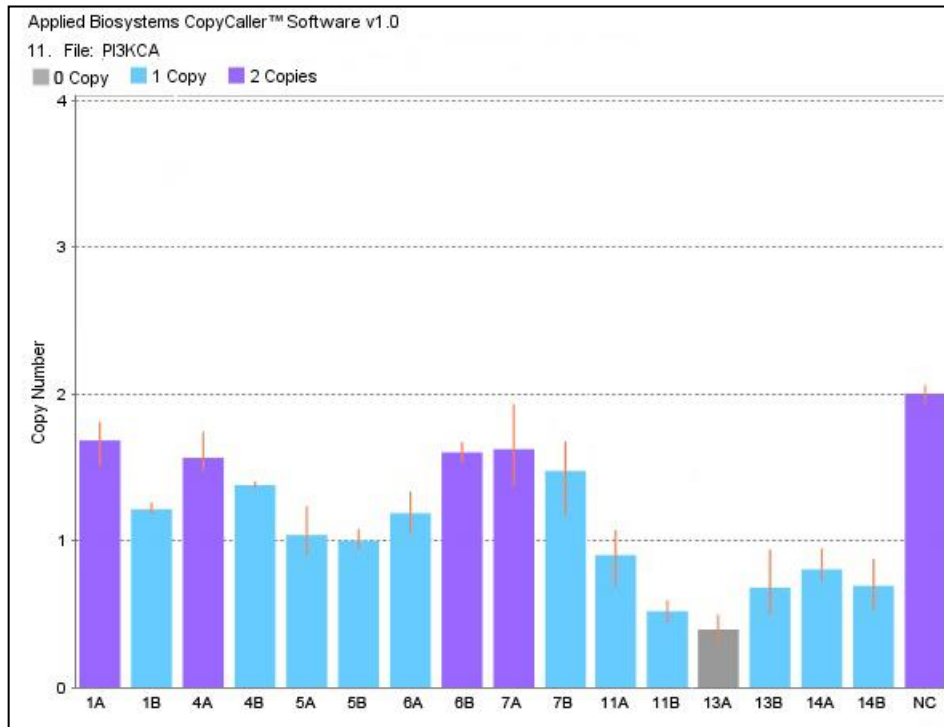
As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 24: Análise de número de cópias do gene *HER2* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



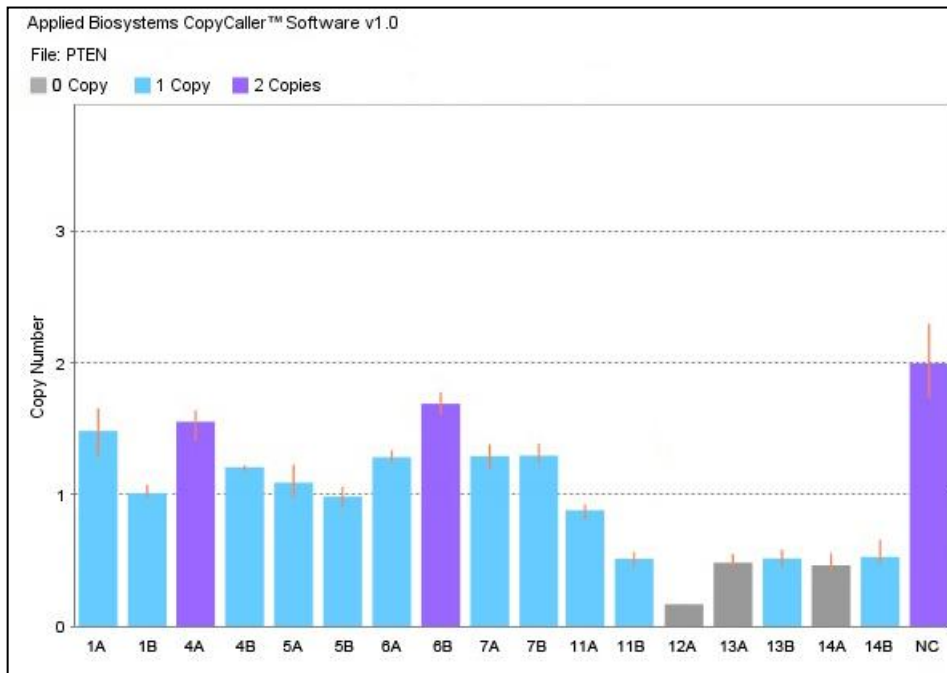
As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 25: Análise de número de cópias do gene *PIK3CA* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

Gráfico 26: Análise de número de cópias do gene *PTEN* nos tumores primários e nas metástases nos linfonodos sentinela.



As letras A representam os tumores primários e as letras B representam as metástases nos linfonodos sentinela de cada caso. NC: controle normal.

A comparação entre os dados do CGH-array com os dados de PCR em tempo real mostrou uma porcentagem baixa de resultados concordantes para os genes analisados. Os genes *BP1* e *HER2* foram os que apresentaram uma maior concordância entre as técnicas, 70,1% e 64,7% dos casos, respectivamente. Para o gene *AKT2*, a concordância ocorreu em 41,2% dos casos, seguido pelos genes *AKT1* e *FGFR2* em 29,4% dos casos. O gene *PIK3CA* apresentou resultados concordantes entre as técnicas em 25,0% dos casos e o gene *PTEN* em 11,8%.

Na tabela 20 estão apresentados os resultados comparativos entre as duas técnicas para os dois genes que apresentaram a maior porcentagem de concordância (*BP1* e *HER2*). Na figura 10 estão apresentados os resultados para estes genes na análise de um caso pareado.

Tabela 20: Número de cópias dos genes *BP1* e *HER2* observado pelas técnicas de CGH-array e PCR em tempo real.

Casos	Número de cópias de DNA – <i>BP1</i>			Número de cópias de DNA – <i>HER2</i>		
	CGH-array	PCR	Validação	CGH-array	PCR	Validação
1A	Deleção	2	-	Normal	2	Sim
1B	Normal	2	+	Normal	2	+
4A	Normal	2	+	Normal	2	+
4B	Normal	2	+	Normal	2	+
5A	Normal	2	+	Amplificação	2	-
5B	Normal	2	+	Amplificação	2	-
6A	Normal	2	+	Normal	2	+
6B	Normal	2	+	Normal	2	+
7A	Amplificação	10	+	Amplificação	8	+
7B	Amplificação	>10	+	Amplificação	10	+
11A	Normal	2	+	Amplificação	1	-
11B	Normal	1	-	Normal	1	-
12A	Normal	1	-	Normal	1	-
12B	Normal	NA	NA	Normal	NA	NA
13A	Normal	4	-	Normal	2	+
13B	Normal	1	-	Normal	2	+
14A	Normal	2	+	Normal	2	+
14B	Normal	2	+	Normal	1	-

NA: não analisado.

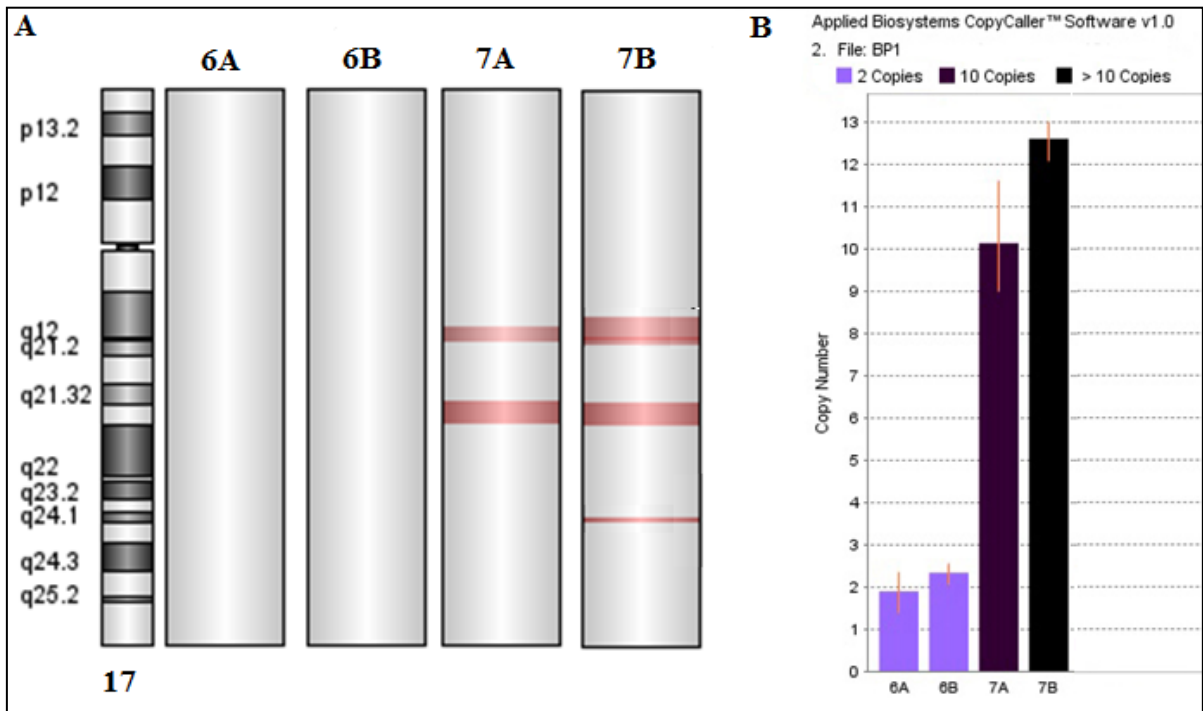


Figura 10: Número de cópias do gene *BP1* observado por CGH-array e PCR em tempo real em dois casos.

A: CGH-array de dois casos pareados de tumores primários (A) e metástases no linfonodo sentinela (B). No caso 6 não foram observadas alterações (normal) no gene analisado. No caso 7 foram observadas ampliações (barras vermelhas) para o gene *BP1* no TP e na metástase do LNS. **B:** PCR em tempo real dos mesmos casos mostrando concordância em relação a alterações do número de cópias do gene *BP1* obtida por CGH-array.

Fonte: a autora (2011).

6.3. Correlação com genes envolvidos na tumorigênese mamária

Dentre as regiões cromossômicas mais comumente alteradas observadas por CGH e as mais comumente alteradas observadas por CGH-array, selecionamos nove regiões cromossômicas (pois estavam alteradas em ambas as técnicas) para correlacionar com a presença de genes envolvidos na tumorigênese mamária. As regiões cromossômicas selecionadas foram: 8q24.3, 11p15.5-p15.4, 11q13.1-q13.4, 16p11.2, 17q12-q21, 17q25.1-q25.3, 20q13.33, 21q22.3 e Xq13.1.

Na tabela 21 estão apresentados os principais genes e microRNAs alterados nessas regiões, sendo que a maioria deles já foi descrita com associação ao câncer de mama, incluindo os processos de progressão tumoral e metástase.

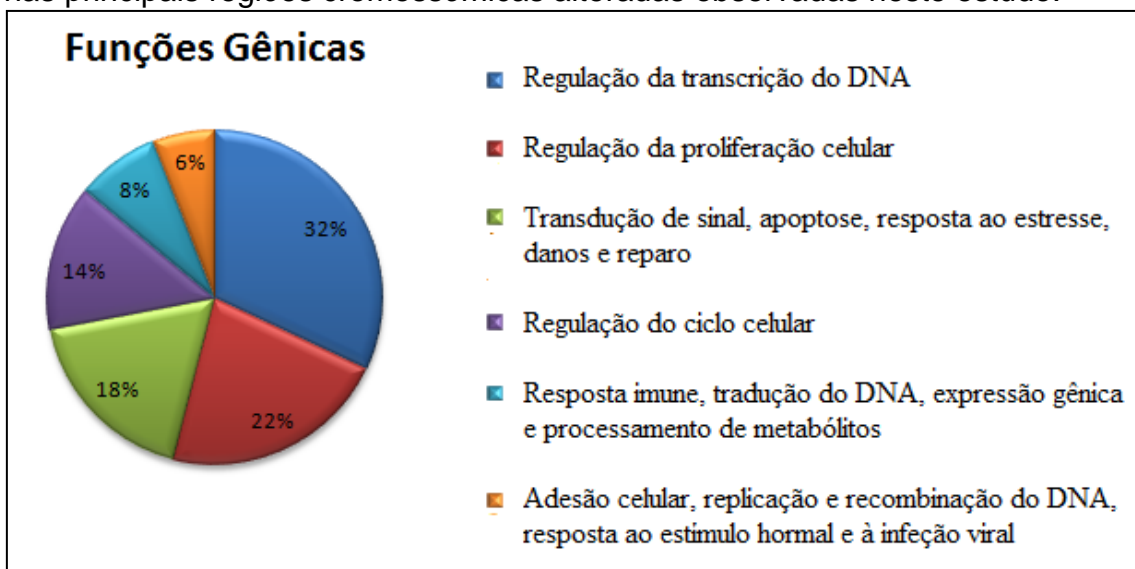
Tabela 21: Regiões mais comumente alteradas, observadas por CGH e CGH-array, e a presença dos respectivos genes e microRNAs alterados nestas regiões.

Região	Genes	MicroRNAs
8q24.3	<i>GPR20, BAI1, ARC, JRK, PSCA, LYPD2, LY6D, CYP11B1, CYP11B2, LY6E, LY6H, FAM83H, PARP10, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC24, MGC70857, KIAA1688</i>	<i>MIR937, MIR661, MIR939, MIR1234</i>
11p15.5-p15.4	<i>HRAS, RASSF7, IRF7, IGF2AS, CDKN1C</i>	<i>MIR210, MIR675, MIR483</i>
11q13.1-q13.4	<i>COX8A, BAD, IGHMBP2, MYEOV, CCND1, FGF19, FGF3, FADD, PPFIA1, CTTN</i>	<i>MIR194-2, MIR1237, MIR192, MIR612, MIR548K, MIR139</i>
16p11.2	<i>TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, CCDC95, TBC1D10B, MYLPP, SEPT1, ZNF48</i>	
17q12-q21	<i>MLLT6, PCGF2, PSMB3, LASP1, RPL19, MED1, NEUROD2, PPP1R1B, STARD3, TCAP, PNMT, ERBB2, GRB7, PSMD3, THRA, NR1D1, CASC3,</i>	
17q25.1-q25.3	<i>SEPT9, TK1, CBX2, RAC3,</i>	<i>MIR636, MIR657, MIR338, MIR1250</i>
20q13.33	<i>BIRC7</i>	<i>MIR1-1, MIR133A2, MIR124-3, MIR941-1, MIR941-2, MIR941-3, MIR1914, MIR647</i>
21q22.3	<i>ABCG1, TFF3, CRYAA, SIK1, AGPAT3, TRAPPC10, PWP2, ICOSLG, DNMT3L, AIRE, PFKL, TRPM2, PTTG1IP, ITGB2PRDM15, C2CD2,</i>	
Xq13.1	<i>PJA1</i>	

Para cada gene, foi investigada a sua função celular e participação em processos biológicos. Esta análise revelou o envolvimento dos genes em mais de 50 funções gênicas/processos biológicos diferentes. A maioria dos genes alterados (32%) participa da regulação da transcrição do DNA, seguidos pela regulação da proliferação celular (22%) e da transdução de sinal, apoptose, resposta ao estresse, resposta a danos e reparo do DNA (18%).

Dentre as outras funções gênicas observadas, em menor frequência, estão: migração e diferenciação celular, transporte, regulação da angiogênese, senescência, entre outras. As funções gênicas observadas no nosso pool gênico e suas respectivas frequências (%) estão apresentadas no gráfico 27.

Gráfico 27: Principais funções gênicas observadas na análise dos genes presentes nas principais regiões cromossômicas alteradas observadas neste estudo.



6.4. Correlação com dados clínico-histopatológicos

A Tabela 22 apresenta informações clínicas das 30 pacientes com tumores analisados por CGH. Observa-se que as mesmas estão incompletas em 20 delas, cujas amostras foram coletadas há mais de seis anos, quando não estavam disponíveis os dados sobre *HER2* e receptores hormonais. Assim, as análises resultando em informações estatisticamente inconsistentes determinaram que as mesmas não fossem utilizadas como um dos objetivos do trabalho.

O tumor primário de duas (6,7%) das pacientes apresentou grau I, de 21 (70,0%) eram do grau II, de três (10,0%) do grau III, e de quatro (13,3%) não se obteve informações. Vinte e cinco (83,3%) pacientes apresentaram carcinoma ductal invasivo, quatro (13,3%) carcinoma lobular invasivo e uma (3,3%) carcinoma túbulo-lobular.

Para a análise da idade e do tamanho dos tumores das pacientes, a amostra foi classificada em dois grupos, empiricamente estabelecidos de acordo com o número médio (10,0) do total de alterações cromossômicas (ganhos + perdas) detectados por CGH nos 30 tumores primários analisados. Assim, a primeira amostra (com menos de 10 alterações cromossômicas) foi constituída por 16 pacientes. Nestas, a média da idade foi igual a $57,19 \pm 13,27$ e, na segunda amostra (com mais de 10 alterações cromossômicas), constituída por 14 pacientes, a idade média foi de $56,50 \pm 9,57$. O tamanho médio dos tumores das pacientes do primeiro grupo foi igual a $3,47 \pm 2,26$ e do segundo grupo $3,29 \pm 2,10$. A diferença entre as médias não foi estatisticamente significativa nem para idade ($t=0,16; P>0,80$) e nem para o tamanho dos tumores ($t=0,23; P>0,80$).

Do grupo de 10 pacientes (casos 1 a 10) cujo material foi coletado mais recentemente (2009 e 2010), seis (60%) apresentaram informações sobre *HER2*: três (50%) classificadas como 0, duas (33,3%) como +1, e uma (16,7%) como +3. Todas as seis (86%) pacientes com informações para RE eram positivas. Também, seis pacientes apresentaram informações para RP: cinco (83,3%) positivas, uma (16,7%) <5%.

Tabela 22: Dados clínico-histopatológicos das 30 pacientes analisadas por CGH.

Caso	Idade (anos)	TT (cm)	Patologia	GH	HER2	RE	RP
1	73	3,0	CDI	II	+3	+	+
2	69	1,8	CDI	si	si	si	si
3	55	2,5	CLI	si	si	si	si
4	45	4,5	CLI	II	0	+	+
5	53	1,8	CDI	II	+1	+	<5%
6	61	8,0	CDI	III	0	+	+
7	58	2,0	CDI	III	si	si	si
8	57	3,0	CDI	I	+1	+	+
9	35	3,2	CTB	II	0	+	+
10	67	1,4	CDI	II	si	si	si
11*	53	2,5	CDI	II	si	si	si
12*	45	4,0	CDI	I	si	si	si
13*	66	1,0	CDI	II	si	si	si
14*	54	5,5	CDI	II	si	si	si
15*	75	8,0	CDI	II	si	si	si
16*	58	1,0	CDI	II	si	si	si
17*	37	2,0	CDI	II	si	si	si
18*	59	2,0	CDI	II	si	si	si
19*	34	2,8	CDI	II	si	si	si
20*	59	2,0	CDI	II	si	si	si
21*	50	3,5	CDI	II	si	si	si
22*	56	3,5	CDI	si	si	si	si
23*	67	5,0	CLI	si	si	si	si
24*	44	1,2	CDI	II	si	si	si
25*	51	6,0	CDI	II	si	si	si
26*	64	5,5	CDI	II	si	si	si
27*	47	5,0	CLI	II	si	si	si
28*	75	8,0	CDI	II	si	si	si
29*	64	0,8	CDI	II	si	si	si
30*	75	1,0	CDI	III	si	si	si

TT: Tamanho do tumor; HER2: amplificação do gene HER2; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI : carcinoma lobular invasivo; CTB: carcinoma túbulo-lobular; GH: grau histológico; si: sem informação; *: amostras de Santos et al., 2008.

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, responsável por 22% dos casos novos a cada ano. É também o segundo tipo mais frequente no mundo. Quando diagnosticado em um estágio inicial e tratado adequadamente, o prognóstico é relativamente bom. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos ao diagnóstico é de 61%. Entretanto, no Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada tarde, quando esta já se encontra em estágios avançados (INCA/MS, 2011).

Atualmente, o prognóstico o câncer de mama é baseado em parâmetros histológicos e clínicos, como a 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 do receptor do fator de crescimento epidermal (*HER2*). Destes, a determinação de células tumorais nos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais eficaz (LINDAHL et al., 2000), sendo que a presença destas confere um alto risco de recorrência da doença.

O estadiamento do câncer de mama é baseado na análise dos linfonodos axilares, ou seja, se houver a presença de células tumorais mamárias nestes linfonodos, os pacientes são submetidos ao esvaziamento axilar completo, que apesar de ser um método confiável de controle de recorrência, está associado com uma alta morbidade (SAKORAFAS et al., 2000; WRIGHT et al., 2003). A biópsia do linfonodo sentinela vem sendo utilizada no sentido de propiciar o estadiamento do câncer de mama através de procedimentos pouco ou não-invasivos, diminuindo a morbidade e aumentando a qualidade de vida da paciente.

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo da cadeia linfática axilar e, portanto, o primeiro a apresentar células malignas nos cânceres de mama que metastatizam. A positividade deste linfonodo é informativa sobre o estado dos demais linfonodos axilares (GUENTHER et al., 2003; VERONESI et al., 2003) e é utilizada como uma indicação para o esvaziamento axilar (GIULIANO, 1996; BRESLIN et al., 2000; VERONESI et al., 2001). Desta forma, a avaliação deste linfonodo para a detecção da presença de células tumorais é de grande importância. Os métodos atualmente disponíveis (análise histopatológica e menos

freqüentemente a detecção de marcadores moleculares tumorais por RT-PCR) não apresentam sensibilidade satisfatória. Devido ao estabelecido valor preditivo da biópsia do LNS na prática clínica, é de fundamental importância a utilização de métodos sensíveis e precisos para a detecção das células tumorais mamárias neste linfonodo, para que se possa prever com segurança quais os pacientes que apresentam risco aumentado de comprometimento de outros nódulos axilares e, conseqüentemente, de alta taxa de recidiva.

Neste estudo, um dos nossos objetivos foi caracterizar as células tumorais presentes no LNS quanto à presença de alterações de número de cópia de DNA. Quinze amostras pareadas de tumor primário mamário e metástase no linfonodo sentinela do mesmo paciente foram analisadas utilizando os métodos de CGH e CGH-*array*.

As alterações cromossômicas observadas foram comparadas entre os tumores primários e as metástases nos linfonodos sentinela correspondentes, com os objetivos de caracterizar essas alterações, definir se o mesmo padrão de alterações ocorre em ambas as lesões, se há alterações nos tumores primários que possam ser indicativas de predisposição à ocorrência de metástases ou se há alterações restritas às metástases. Análises de comparações de alterações genéticas entre lesões primárias e metastáticas no câncer de mama vêm sendo realizadas (KUUKASJÄRVI et al. 1997a; NISHIKAZI et al., 1997; PANDIS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002, TORRES et al., 2007; BECKER et al., 2008; POPLAWSKI et al., 2010). No entanto, a maioria tem se limitado a linfonodos axilares distais e/ou metástases hematogênicas. Análises em linfonodos sentinela foram realizadas por poucos grupos de pesquisa (CAVALLI et al., 2003; SANTOS et al., 2008; WANG et al., 2009).

Observamos, por CGH, um número maior de alterações cromossômicas em tumores primários (300) do que em metástases nos linfonodos sentinela (256). Embora a diferença não seja estatisticamente significativa na proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1, isso pode refletir a heterogeneidade de diferentes clones com diferentes perfis genômicos presentes no tumor primário, o que está relacionado aos diferentes estágios do desenvolvimento do tumor.

Como referido em Resultados, as informações obtidas por CGH foram analisadas tanto para casos (unidade de análise: a paciente), como para cromossomos (unidade de análise: o cromossomo). No primeiro caso, a análise da variância indicou um valor estatisticamente significativo para as alterações cromossômicas, identificadas pelo teste de Duncan como ocorridas entre a média de ganhos nos TP com as de perdas tanto nos TP como nas metástases no LNS. O teste do qui-quadrado, aplicado ao total de aberrações cromossômicas (ganhos + perdas) observadas nos TP e nas metástases nos LNS nas 30 pacientes nos fornece uma informação interessante, já que a sua distribuição, homogênea ou não, já é indicativa da dependência da ocorrência das mesmas nos LNS em função das dos TP. O resultado deste teste foi estatisticamente significativo indicando que nos 30 casos analisados o total de alterações cromossômicas não se distribuiu igualmente. Esta heterogeneidade da distribuição das alterações cromossômicas é melhor definida, quantitativamente, pelos resultados do coeficiente de regressão utilizado, considerando-se que o tumor primário, sendo o primeiro evento cancerígeno, é a variável independente e que as metástases nos linfonodos sentinela, sendo de ocorrência conseqüente (e subsequente), se caracterizam como eventos dependentes do primeiro. Realmente, como indicado pelo teste do qui-quadrado, os resultados do coeficiente de regressão (ver Resultados) não foram estatisticamente significantes, tanto para ganhos de alterações cromossômicas, como para perdas, e ainda para o total das mesmas (ganhos+perdas). Assim, na nossa amostra, o número de alterações cromossômicas observadas nos LNS das 30 pacientes analisadas não depende do número de alterações dos TP.

Já, quando os cromossomos foram considerados como unidade de análise, a comparação entre as médias das alterações cromossômicas para cromossomos, pela análise de variância, foi inviabilizada pelo resultado do teste de Bartlett, que indicou que os quadrados médios das amostras apresentavam diferenças estatisticamente significantes. No entanto, o teste *t* de Student utilizado (respeitando o rigor estatístico) forneceu resultados no mesmo sentido dos observados pelo teste de Duncan, como acima foi descrito para casos. Novamente, identificou-se que a média de ganhos de alterações cromossômicas nos 23 cromossomos foi maior, e estatisticamente significativa, do que as médias de perdas tanto dos TP como das metástases dos LNS. O teste do qui-quadrado, não sendo estatisticamente significativo, indicou que o total de alterações cromossômicas se distribuíram

igualmente nos 23 cromossomos analisados e, como esperado, os valores do coeficiente de regressão foram estatisticamente significantes, tanto para ganhos como para perdas, e ainda para o total de alterações cromossômicas, demonstrando que o número das mesmas observado nos LNS depende do número que ocorre nos TP.

A análise de *CGH-array*, ao contrário do observado na análise por CGH, revelou um maior número de alterações nas metástases nos linfonodos sentinela (95) do que nos tumores primários (93). Embora estes resultados sejam muito semelhantes, estão de acordo com os descritos por NISHIKAZI et al. (1997), que observaram um número maior de alterações cromossômicas nas metástases nos linfonodos axilares quando comparados com 11 tumores primários correspondentes. As alterações nas metástases nos linfonodos são geralmente descritas como menos heterogêneas geneticamente do que as presentes nos tumores primários. Possivelmente, como resultado 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).

Na análise estatística dos dados obtidos por *CGH-array*, seguimos o mesmo procedimento utilizado para a análise dos dados de CGH. Tanto para casos como para cromossomos, o teste de homogeneidade das variâncias indicou valores estatisticamente significantes. Para casos, as médias de ampliações e de deleções de alterações cromossômicas foram, respectivamente, muito semelhantes ou iguais nos TP e nos LNS, tornando desnecessária a comparação estatística entre as mesmas. Para cromossomos, as comparações entre as diferenças das médias de ampliações e de deleções, tanto nos TP como nos LNS, foram estatisticamente significativas, demonstrando, uma vez mais, que a presença adicional de material genético nos cromossomos é estatisticamente maior do que a falta do mesmo. Como nos dados obtidos por CGH, nos de *CGH-array* também observou-se que as alterações cromossômicas não estão homogeneamente distribuídas quando consideramos as pacientes como unidade de análise, e apresentam-se homogeneamente distribuídas quando os cromossomos são a unidade de análise. Isso determinou, como na análise por CGH, que nos cromossomos há uma dependência da ocorrência do número de alterações cromossômicas (com exceção

das deleções) nos LNS em função das que ocorrem nos TP. Estes resultados, tanto no CGH como no CGH-array, são interessantes porque demonstram que nas pacientes o número de alterações cromossômicas que ocorrem no LNS não depende do número observado no TP. Já, quando consideramos o conjunto dos 23 cromossomos, independente das pacientes, detecta-se que há uma dependência estatisticamente demonstrada. Assim, de acordo com os dados da nossa amostra, os cromossomos é que são a unidade de análise relevante para a ocorrência quantitativa das aberrações cromossômicas nos LNS em função das do TP, e não a paciente. Evidentemente que, de acordo com o método científico, estas informações devem ser interpretadas com cautela e avaliadas pela reprodutibilidade das mesmas, utilizando os mesmos ou outros métodos e amostras de tamanho mais consistente.

Os nossos dados demonstrando, tanto por CGH como por CGH-array (exceção para casos em CGH-array), que ganhos ou ampliações de regiões cromossômicas são mais frequentes, com diferenças estatisticamente significativas, do que as perdas ou deleções, indicam que os oncogenes têm uma função quantitativamente relevante na tumorigênese mamária quando comparados com os genes supressores de tumor. No entanto, deve-se salientar que qualitativamente a mesma comparação não é apropriada. Considerando que os oncogenes são dominantes ao nível celular e os genes supressores de tumor recessivos (com exceções, como, por exemplo, o *TP53* - dominante negativo), este achado já era esperado e é frequentemente descrito por outros autores (INGVARSSON, 2004).

Em relação a alterações cromossômicas em comum entre os casos pareados, 26 dos 30 (86,7%) casos analisados por CGH apresentaram pelo menos uma alteração cromossômica em comum. Essa frequência é maior do que as descritas por KUUKASJÄRVI et al. (1997a), que identificaram relação clonal em 70% das metástases e dos tumores primários correspondentes e 30% de divergência. Em nosso estudo, as alterações mais comuns em ambos os grupos foram: ganhos em 1p, 1q, 6p, 8q, 9q, 11p, 12q, 16, 17, 18p, 19, 20, 21q e 22, e perdas em 1p, 2q, 4q, 6q, 13q, 18q e Xq. 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 por KUUKASJÄRVI et al. (1997a), em tumores primários pareados com tumores

metastáticos localizados em diferentes sítios anatômicos, indicando uma relação clonal entre essas lesões. Com esses resultados pode-se sugerir que ganhos em 1q e 17q e perdas em 6q e 13q ocorrem em estágios iniciais da carcinogênese mamária, precedendo alterações mais complexas observadas durante a progressão metastática.

O CGH-*array*, no presente estudo, detectou alterações cromossômicas em comum entre 5 dos 10 (50%) casos pareados analisados. As regiões cromossômicas mais frequentemente alteradas em ambos os grupos foram: 1q21.1-q25.3 (4 ampliações e 2 deleções), 8q24.3 (5 ampliações), 10q26.3 (3 ampliações), 11p15.5-p15.4 (5 ampliações e 2 deleções), 11q13.1-q13.4 (4 ampliações e 4 deleções), 14q21.1 (3 ampliações), 16p11.2 (3 ampliações), 17q12-q21 (4 ampliações), 17q25.1-q25.3 (3 ampliações), 20q13.33 (5 ampliações), 21q22.3 (3 ampliações e 1 deleção) e Xq13.1 (5 ampliações e 1 deleção).

Observa-se que tanto na análise por CGH como por CGH-*array*, a frequência de alterações não compartilhadas pelos tumores primários e pelas metástases nos linfonodos sentinela (76,3% e 85,1%, respectivamente) é alta, sugerindo que muitos clones são submetidos a uma forte pressão seletiva durante o processo de metastatização. No entanto, ressalte-se que das 25 alterações mais frequentes detectadas por CGH, tanto nos TP como nos LNS, 80% delas foram comuns a ambos os tecidos, e esta frequência chega a 90% das 10 mais frequentes quando consideramos os dados de CGH-*array*. Evidentemente que estes dados não são desprezíveis para a identificação de marcadores moleculares potencialmente capazes de informar sobre o prognóstico metastático de um tumor primário, de acordo com uma das hipóteses que admite que a metastatização é um evento que já pode ser determinado geneticamente no tumor primário (VAN'T VEER et al., 2002; RAMASWAMY et al., 2003; JONES et al., 2008; STOECKLEIN E KLEIN, 2010).

As análises de CGH e a de CGH-*array*, tanto nos TP como nas metástases dos LNS, identificaram o maior número de alterações no cromossomo 1. Foram observadas nesse cromossomo, por CGH, 34 alterações nos TP e 27 nas metástases nos LNS, sendo que o número de ganhos foi maior que o de perdas (29 e 21, respectivamente). O perfil geral do CGH (TP + LNS, figura 5) apresenta alterações no cromossomo inteiro, com ganhos em 1p e 1q (principalmente

+1pter~p32 e +1q22~qter) e perdas em 1p (-1p31~p21). Por *CGH-array*, o cromossomo 1 apresentou 10 alterações (8 ampliações e 2 deleções) nos TP e 12 (9 ampliações e 3 deleções) nas metástases nos LNS. As regiões mais comumente alteradas foram 1p36.21 e 1q21.1-q25.3.

As alterações no cromossomo 1 são freqüentemente observadas em tumores de mama, assim como em outros tipos de tumores sólidos (STRUSKI et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2002; CHAUDHARY e SCHMIDT, 2006). Ganhos em 1p foram descritos em uma série de estudos que utilizaram *CGH* (LOVEDAY et al., 2000; WEBER-MANGAL et al., 2003; NESSLING et al., 2005). MANGIA et al. (2008), estudando tumores BRCA, identificaram, além de ganhos em 1p, ganhos em regiões pouco descritas como 4p, 4q, 5p, 12q e 19p. As perdas em 1p foram observadas em 8 dos 30 (26,7%) casos analisados nesse estudo. Esta alteração também foi descrita por outros pesquisadores, como um evento recorrente em tumores de mama (HERMSEN et al., 1998; TIRKKONEN et al., 1998; VALLADARES et al., 2004).

Diversos estudos observaram, também por *CGH*, ganhos em 1q, sendo que em alguns casos essa foi a alteração mais freqüente (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). Como nos tumores primários, também foram observados ganhos em 1q em lesões metastáticas. KUUKASJÄRVI et al. (1997a) estudaram 29 amostras de metástases correspondentes a tumores primários de mama, localizadas em diversos sítios anatômicos (linfonodos regionais, supraclavicular, pulmão, cavidade abdominal, medula óssea e outros), e observaram uma frequência de 52% de ganhos em 1q e 28% de perdas em 1p. 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.

A utilização do *CGH-array* tem como objetivo refinar a identificação das regiões cromossômicas alteradas em câncer de mama, facilitando a identificação de genes em tais regiões. 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; FRIDLYAND et al., 2006). POPLAWSKI et al. (2010), analisando amostras pareadas de tumor primário e metástases, identificaram ganhos em 1q adquiridos

nas metástases e sugeriram que uma maior investigação sobre os mesmos por parecem estar relacionados a um pior prognóstico.

STANGE et al. (2006) analisaram carcinomas ductais invasivos e carcinomas lobulares invasivos e concluíram que alterações de número de cópia em 1q e 16p poderiam diferenciar esses dois tipos de carcinoma. Em relação aos ganhos em 1q, as regiões 1q24.2-25.1 e 1q25.3-q31.3 foram as que apresentaram mais alterações. A região 1q25.3 está presente no intervalo 1q21.1-q25.3, que foi observado alterado em 6 (60%) casos analisados por CGH-array no presente estudo. Essa região cromossômica vem sendo considerada um sítio frágil no câncer de mama (WIECHEC et al., 2008, 2011).

A alta frequência 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. No estudo de STANGE et al. (2006), citado acima, foram identificados dois genes: *FMO2* e *PTGS2 (COX2)*. A desregulação do gene *PTGS2 (COX2)* já foi observada em tumores epiteliais e tem sido associada com cânceres de mama mais agressivos (tumores com tamanho grande, linfonodos axilares positivos e *HER2* positivo) (Arun et al., 2004; Saji et al., 2004, citados por STANGE et al., 2006). 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.

Alterações no número de cópias do DNA no cromossomo 6 também foram frequentemente observadas nos casos analisados e as perdas detectadas em 6q, principalmente na região 6q13~q23, corroboram resultados encontrados por outros autores (KUUKASJÄRVI et al.; 1997a; NISHIKAZI et al., 1997; RICHARD et al., 2000; JOHNSON et al., 2008).

Genes supressores de tumor vêm sendo pesquisados em 6q. Um possível gene supressor, *SASH16 (6q24.3)*, 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, sugerindo que outros mecanismos, como por exemplo, metilação da região promotora do gene, podem ser responsáveis pela perda da expressão do mesmo (ZELLER et al., 2003). Outro gene candidato, *HIVEP2 (6q23~q24)*, apresentou o nível de expressão protéica significativamente reduzido em cânceres de mama em relação ao tecido normal, o

que pode representar um dos eventos genéticos envolvido na carcinogênese mamária (FUJII et al., 2005).

Em relação ao cromossomo 8, ganhos e ampliações em 8q foram observados por CGH e CGH-array. Ganhos em 8q já foram descritos como associados a uma alta taxa de proliferação celular, parcialmente explicada pela amplificação do gene *C-MYC*. No presente estudo, a maioria dos ganhos e ampliações foi observada em 8q24.3, região cromossômica próxima ao loci do *C-MYC* (8q24.1). Entretanto, a amplificação deste gene não foi observada, assim como em outros estudos (YAO et al., 2006; HAN et al., 2010). Isso pode indicar que existem outros genes importantes para a tumorigênese mamária em 8q24.

A região 8q24 está frequentemente amplificada no câncer de mama e, primeiramente, através de estudos com CGH, sugeriu-se que essa região fosse um único amplicon. A resolução aumentada do CGH-array possibilitou a distinção de diferentes regiões que contêm ganho de número de cópias de DNA em 8q24 e vários genes que podem estar envolvidos no câncer de mama: *PTK2 (FAK)*, *GPR20*, *BAI1*, *ARC*, *JRK*, *PSCA*, *ARS*, *LYNX1*, *LY6D*, *GML*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *LY6E*, *HHCM*, *LY6H*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *COL22A1*, *KCNK9*, *CHRAC1*, e *EIF2C2* (NAYLOR et al., 2005; CHIN et al., 2007; HAVERTY et al., 2008). HAWTHORN et al. (2010) encontraram 3 regiões com ganhos em 8q24, e três genes com expressão gênica aumentada: *FAM83H*, *RECQL4* e *KIFC2*. O gene *RECQL4* já havia sido associado com um aumento do potencial metastático em tumores de mama (THOMASSEM et al., 2009).

O cromossomo 11 também apresentou um grande número de alterações no presente estudo, sendo o segundo mais alterado nos resultados do CGH-array (9 alterações nos TP e 10 nas metástases dos LNS). As regiões mais comumente alteradas foram 11p15.5-p15.4 e 11q13.1-q13.4. Ambas as regiões apresentaram tanto ampliações como deleções, corroborando alterações previamente descritas em câncer de mama. PIERGA et al. (2007) analisaram tumores mamários antes e depois do tratamento quimioterápico neoadjuvante (amostras de biópsia e peça cirúrgica) e observaram amplificação adquirida da região 11p15.2-p15.5 nas amostras cirúrgicas. Por outro lado, HAN et al. (2010) estudaram tumores RE+ que apresentavam recorrência, mesmo após o tratamento com Tamoxifeno, na tentativa de identificar marcadores de prognóstico para esse subtipo de câncer. Dentre as alterações cromossômicas mais significantes, no grupo de recorrência, estava a

deleção em 11p15.5-p15.4. Ao ajustar o resultado observado de acordo com o status linfonodal, os autores encontraram a deleção de 11p15.5 no grupo positivo (LN+).

Análises de padrões de metilação em 11p15 têm sido frequentes. A deleção dessa região em diferentes tipos de câncer sugere a presença de genes supressores de tumor, sendo que o ganho de *imprinting* pode determinar a perda de expressão gênica. SCELFO et al. (2002) observaram que a perda de metilação do gene materno *KvDMR1* é comum no câncer de mama, fígado, cervical e gástrico (frequência de 30 a 50%). GALLAGHER et al. (2006) também observaram ganho de *imprinting* em 11p15.5 em tumores de mama.

Ganhos em 11q também já foram descritos. A amplificação do gene *CCND1*, localizado em 11q13.2, tem sido observada em cânceres de mama, sendo que ROY et al (2010) a observaram em 29% de 93 tumores de mama RE+. GRUEL et al. (2010), estudando carcinomas lobulares invasivos, também encontraram a amplificação, e conseqüente superexpressão, desse gene. PIERGA et al. (2007) observaram ganhos em 11q, em tumores RE-, e JONSSON et al. (2010) detectaram ganhos especificamente em 11q13. Além disso, alterações em 11q já foram previamente relacionadas com uma baixa taxa de sobrevida em pacientes com câncer de mama (ALBERTSON, 2006; CHIN et al., 2007; PATERSON et al., 2007).

Ganhos do número de cópias no cromossomo 16 foram freqüentes nos casos estudados no presente estudo, sendo que nos tumores primários foram observadas, por CGH, 25 alterações (22 ganhos e 3 perdas) e nas metástases dos linfonodos sentinela 17 (15 ganhos e 2 perdas). Por CGH-*array*, observou-se no cromossomo 16 um maior número de alterações nas metástases dos linfonodos sentinela, sendo 4 amplificações e 4 deleções. Considerando os TP e os LNS, as regiões cromossômicas principalmente alteradas foram 16p13.3, 16q24.3 e 16p11.2, com a última se mostrando mais alterada quando consideramos todas as amostras analisadas em conjunto.

Outros estudos também descreveram alterações de ganho de número de cópia na região cromossômica 16p11.2 (MULERIS et al., 1994; STANGE et al., 2006; PARRIS et al., 20010). Após observarem ganhos nessa região cromossômica presente em todos os 40 cânceres de mama invasivos analisados, 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. Em um estudo mais recente, PARRIS et al. (2010) identificaram um aumento do número geral de alterações cromossômicas durante a progressão de tumores mamários em 15 regiões cromossômicas específicas (incluindo 16p11.2), que apresentaram o número de cópias de DNA alterado em pelo menos 25% da amostra (n=97).

Em muitos estudos foram observadas alterações de perda em 16q (NISHIKAZI et al., 1997; TIRKKONEN et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002; RENNSTAM et al., 2003; ROYLANCE et al., 2006; STANGE et al., 2006). A perda completa do braço longo do cromossomo 16 é uma alteração comum e inicial em tumores de mama *in situ* e invasivos, sendo que está associada com a diminuição da expressão de diversos genes em 16q (*CDA08*, *CGI-128*, *SNTB2*, *NQO1*, *SF3B3*, *KIAA0174*, *ATBF1*, *GABARAPL2*, *KARS*, *GCSH*, *MBTPS1* e *ZDHHCT*) (HURGERMANN et al., 2011). Genes supressores de tumor, como o gene da E-caderina, vêm sendo investigados, principalmente pela análise de perda de heterozigosidade, entretanto os resultados ainda não são consistentes (DROUFAKOU et al., 2001; RAKHA et al., 2006; ROYLANCE 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 estrogênio e progesterona e uma taxa de sobrevida geral maior do que em outros pacientes (RENNSTAM et al., 2003; FARABEGOLI et al., 2004). Em nosso estudo, 6 casos (10%) analisados por CGH e apenas 1 caso (5%) analisado por CGH-array apresentaram perda em 16q, o que não permite avaliações consistentes.

O cromossomo 17 é outro alvo de investigação intensa no câncer de mama. É estabelecido que a amplificação da região 17q12-q21 (amplificada em 20% dos casos analisados por CGH-array do presente estudo) é o mecanismo mais comum de ativação do oncogene *HER2* no câncer de mama, determinando a co-ativação de vários outros genes. Os genes co-amplificados e co-ativados podem ter um papel importante na progressão da doença e na resposta clínica, representando então importantes alvos de pesquisa (KAURANIEMI e KALLIONIEMI, 2006).

Na região 17q12-q21 já foram descritos 11 genes com um suposto envolvimento no desenvolvimento do câncer de mama (*MED1*, *STARD3*, *HER2*, *GRB7*, *THRA*, *RARA*, *TOP2A*, *IGFBP4*, *CCR7*, *KRT20*, *KRT19* e *GAS*) (EJLERTSEN et al., 2010; LAMY et al., 2011). LAMY et al. (2011) avaliaram genes localizados em 17q e observaram que a amplificação de *RARA*, *KRT20* e *KRT19* estava significativamente associada com tumores com linfonodos positivos ($P = 0.030$, $P = 0.002$ e $P = 0.033$, respectivamente). Os autores concluíram que a amplificação do *HER2* possivelmente orienta a instabilidade genômica em 17q, resultando em diferentes padrões de amplificações gênicas.

O estudo de WANG et al. (2009) analisou carcinomas ductais invasivos com metástases no LNS e metástases distais. Dentre as regiões que mais apresentaram ganhos de número de cópia no grupo de carcinomas com metástases no LNS, estava 17q23-q25.

Nesse estudo, observamos também amplificações na região 17q25.1-q25.3 (15% dos casos analisados por CGH-array). A região 17q25.1, entretanto, vem sendo descrita como local de perdas/deleções de número de cópias de DNA, inclusive com genes com baixa expressão, como os já identificados: *TOC*, *DMC1* e *DMHC* (FUKINO et al., 1999; HARADA et al., 2001; MIKAMI et al., 2001). O gene *TK1*, localizado em 17q25.2-q25.3, apresentou perda de heterozigidade em tumores primários de mama, evidenciando também deleções nessa região (PETTY et al., 1996). Na região 17q25.3 foram descritas amplificações (MONTAGNA et al., 2003; HWANG et al., 2008) e deleções (MORRIS et al., 2000).

Ganhos em todo o cromossomo 19, 20, em 21q e em 22q foram observados por CGH na maioria dos casos analisados. Entretanto, a análise conjunta com dados de CGH-array, revelou que 20q e 21q foram mais comumente alteradas. Diversos estudos descreveram uma alta frequência de ganhos no cromossomo 20, tanto por CGH, como por CGH-array (CINGOZ et al., 2003; RENNSTAM et al., 2003; FARABEGOLY et al., 2004; NESSLING et al., 2005; FRIDLAND et al., 2006).

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 RP- (RENNSTAM et al., 2003).

Na região 20q13 está localizado o gene *BTAK*, cuja amplificação e expressão aumentada têm sido observadas em cânceres de mama, e parecem estar

associadas ao início da 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, MIYOSHI et al. (2001) observaram associações positivas entre a expressão aumentada do gene *BTAK* com tumores de alto grau histológico e negativos para receptores de estrógeno e progesterona, sugerindo que este evento possa indicar um pior prognóstico e resistência à terapia endócrina.

Em nosso estudo, encontramos principalmente amplificações na região 20q13.33. O mesmo foi descrito por HAN et al. (2010), que utilizaram *CGH-array* para avaliar se a resposta à terapia neoadjuvante poderia ser predita por diferentes alterações genéticas. As pacientes que não respondiam à terapia apresentaram alterações genéticas mais complexas do que as que respondiam, sendo que 57% dos ganhos/amplificações foram observados em 20q. Entre as menores regiões cromossômicas com ganhos estava 20q13.33.

Um dos genes localizados em 20q13.33, o *D54*, foi analisado em 95 tumores de mama por SHERATA et al. (2008), e verificou-se que o mesmo estava significativamente superexpresso em relação ao tecido normal. Algumas alterações cromossômicas associadas à genes candidatos podem contribuir também para defeitos do centrôssomo. Por exemplo, o ganho da região 20q13.2 foi observado, por GAO et al. (2011), principalmente em tumores com uma maior expressão da proteína do centrôssomo. Essa região cromossômica contém o gene candidato *STK15*, que codifica uma quinase associada ao centrôssomo, que pode induzir a sua duplicação, causando anormalidades de distribuição cromossômica e aneuploidias em células de mamíferos. Essa quinase já foi descrita superexpressa em diferentes tipos de tumores humanos, incluindo o de mama (ZHOU et al., 1998).

Ganhos em 21q, presentes em nosso estudo, corroboram outros da literatura. Analisando carcinomas de mama do tipo ductal *in situ*, AUBELE et al. (2000) observaram que os mesmos eram predominantemente caracterizados por ganhos de número de cópias e acharam alterações cromossômicas consistentes em 21q. Em outro estudo, tumores RE-, comparados com RE+, apresentaram, entre outras alterações cromossômicas, ganhos em 21q (FANG et al., 2011).

A região 21q22.3 apresentou 3 amplificações e 1 deleção, no presente estudo, quando analisada por *CGH-array*. Também utilizando esse método,

HWANG et al. (2008) analisaram 62 tumores de mama primários, observando ganhos de cópias nessa mesma região.

Em relação ao cromossomo X, alterações cromossômicas, principalmente em Xq, foram observadas em diversos estudos. Utilizando CGH, observamos principalmente perdas em Xq, entretanto, a análise por CGH-*array* identificou uma pequena região no braço longo (Xq13.1) que apresentou 5 ampliações e 1 deleção apenas.

SIMPSON et al. (2008) estudaram carcinomas lobulares pleomórficos, um tipo de câncer de mama que apresenta características associadas ao carcinoma lobular in situ, mas com um comportamento clínico mais agressivo. Entre as alterações de número de cópia mais recorrentes nessa amostra, observaram perdas em Xq. Essas, também já foram descritas em cânceres de mama do tipo basal (YU et al., 2009) e também na análise de 24 linhagens tumorais de câncer de mama (SALITO et al., 2009).

Ganhos em Xq foram observados entre as alterações comuns em uma análise conjunta com cânceres de mama dos tipos ductal in situ, invasivo e hiperplasia ductal atípica (Gao et al., 2009). GAO et al. (2011) também observaram ganhos em Xq e sugeriram genes candidatos envolvidos na carcinogênese mamária. Um deles seria o gene *HHR6A*, que codifica a proteína Rad6, um importante fator de transcrição com função relevante na interfase e em estágios mitóticos do ciclo celular.

Neste estudo, realizamos a validação das alterações observadas por CGH-*array* em sete genes específicos: *AKT1*, *AKT2*, *BP1*, *FGFR2*, *HER2*, *PIK3CA* e *PTEN*. Estes genes foram selecionados devido as suas respectivas relevâncias e participações na tumorigênese mamária, incluindo o processo de metastatização.

O receptor 2 do fator de crescimento epidermal (*HER2*) foi observado amplificado em uma linhagem tumoral mamaria há mais de 25 anos (KING et AL., 1985) e sua amplificação foi caracterizada como importante para a patogenia e progressão do câncer de mama 2 anos depois, em 1987 (SLAMON et al., 1987). Desde então, a amplificação desse gene e a superexpressão da proteína codificada pelo mesmo foi associada a importantes vias de proliferação tumoral. Atualmente o gene *HER2* é considerado um marcador tumoral que é avaliado rotineiramente para a determinação do prognóstico e também do tratamento pós-cirúrgico. Assim como o

RE e RP, cujas pacientes positivas são tratadas pelo Tamoxifeno ou inibidores de aromatase, para as pacientes com amplificação do *HER2* é indicado um tratamento específico com o anticorpo monoclonal Trastuzumab, que bloqueia especificamente os domínios intracelulares e/ou extracelulares do receptor *HER2*, tornando-o inativo (TUBBS et al., 2001). Entre 15-25% dos cânceres de mama apresentam um alto nível de amplificação do *HER2*. O número de cópias desse gene pode chegar a 25-50 cópias, levando a um aumento de 40-100x de proteína, resultando em aproximadamente 2 milhões de receptores celulares expressos na superfície das células tumorais (KALLIONIEMI et al., 1992). Na análise de tumores primários de mama e metástases em linfonodos sentinela, CAVALLI et al. (2008) observaram amplificação do gene *HER2* em 22% das amostras analisadas.

A proteína BP1 (Beta proteína 1) é codificada por um gene (de mesmo nome) pertencente a superfamília de genes homeobox de fatores de transcrição, e se liga ao DNA com a função de silenciamento de sequências (CHASE et AL., 2002). Estudos com esse gene revelaram que o mRNA estava presente em 80% dos carcinomas mamários ductais infiltrantes analisados, enquanto ausente em amostras normais (FU et al., 2003). Ainda, a proteína BP1 foi detectada, por imunohistoquímica, em 21% das hiperplasias mamárias, 46% dos carcinomas ductais in situ e 81% dos carcinomas ductais infiltrantes, porém foi raramente detectada em tecidos de mama normais (MAN et al., 2005). CAVALLI et al. (2008) avaliaram a amplificação, por FISH, e expressão protéica (por imunohistoquímica) do gene *BP1* em 20 tumores primários e 14 metástases em linfonodos sentinela. O número aumentado de cópias do gene foi encontrado em 36% dos TP e 29% dos LNS, e a proteína estava expressa em 91% das amostras (todos os TP com ganho de cópias do BP1 e em 65% dos TP com número de cópia normal). Os autores concluíram que, além da amplificação gênica, outros mecanismos influenciam a expressão protéica. Além disso, a amplificação do gene, tanto em TP como em LNS, apresentou uma correlação significativa com a amplificação do gene *HER2* (citado acima). Esses resultados sugerem que o *BP1* pode apresentar propriedades oncogênicas, afetando direta ou indiretamente a invasão tumoral mamária e assim pode ser um suposto marcador tumoral para invasão (MAN et al., 2009).

O gene *FGFR2* (Receptor 2 do Fator de Crescimento Fibroblástico) está envolvido em diversas vias de sinalização celulares que contribuem para o crescimento celular e a diferenciação (ESWARAKUMAR et al., 2005). Esse gene é

importante para o desenvolvimento de diferentes tecidos, incluindo a mama (PARSA et al., 2008), sendo que recentemente foi descrito como um fator de risco para o câncer de mama, por apresentar funções importantes no crescimento e invasão celular, motilidade e angiogênese (CHEN et al., 2011). Polimorfismos de cópia única nesse gene foram associados com um aumento da transcrição, podendo contribuir para a susceptibilidade ao câncer de mama (MARTIN et al., 2011). A amplificação do *FGFR2* e superexpressão do mesmo foram descritas em cânceres mamários e gástricos (KATOH e TERADA, 1993; MOFFA et al., 2008), sendo que a amplificação gênica foi correlacionada ao fenótipo tumoral mais maligno (KATOH et al., 2008)

Uma importante via de sinalização intracelular envolvida em processos de crescimento, proliferação, sobrevivência, angiogênese e motilidade celular é a via *P13K/AKT* (KRAUSS, 2008). Estudos têm demonstrado que a desregulação de muitos componentes dessa via tem importante consequência no desenvolvimento de tumores mamários e na resistência a agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama (NAGATA et al., 2004; HU et al., 2009; KIRKGAARD et al., 2010). A investigação de genes da via PI3K tem grande importância, pois pode auxiliar no desenvolvimento de terapias, uma vez que alterações genômicas nesses genes podem indicar respostas ao tratamento.

O receptor epidermal do fator de crescimento (*EGFR* ou *ErbB-1/HER1*) é membro da família de receptores ErbB, que inclui também o *HER2*, *HER3* e *HER4*, importantes mediadores do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. Os efeitos do *EGFR* são mediados, principalmente, pela via de sinalização *PI3K/AKT*. A ativação do *EGFR* desencadeia uma cascata de sinalização, ativando a enzima PI3K (NYATI et al., 2006; ZHOU et al., 2006). A enzima PI3K tem sua subunidade catalítica codificada pelo gene *PIK3CA* (isoforma α), que está localizado em 3q26. Sua função é fosforilar PIP2, transformando-o em PIP3. Este regula a localização de ativação de outras proteínas intracelulares, entre elas as proteínas AKT. Mutações no gene *PIK3CA* que aumentam a atividade enzimática da subunidade catalítica (KANG et al., 2005) e amplificações, têm sido descritas em diversos tipos de câncer, incluindo mama, cérebro, estômago, fígado e ovário (CAMPBELL et al., 2004; SAMUELS et al., 2004; KARAKAS et al., 2006). A frequência de mutações nesse gene no câncer de mama varia de 8-40% (GUSTIN et al., 2008).

A família AKT é composta por três membros: *AKT1*, *AKT2* e *AKT3*, codificados por genes diferentes que se expressam constitutivamente. A ativação de

AKT depende da disponibilidade intracelular de PI3K e ativa o receptor de estrogênio (ER) α e o receptor de andrógeno (CAMPBELL et al., 2001; McCALL et al., 2008), regulando vários processos celulares como apoptose, proliferação e sobrevivência celular, diferenciação, metabolismo e angiogênese (STOKOE, 2001; VIVANCO et al., 2002). A sinalização AKT é frequentemente desregulada nos cânceres humanos devido à ativação de receptores de fator de crescimento e perda do gene *PTEN* (MORGENSZTERN et al., 2005). A atividade enzimática aumentada de AKT1, codificada pelo gene *AKT1*, localizado em 14q32, está associada com um pior prognóstico no câncer de mama e próstata (SUN et al., 2001). A amplificação do gene *AKT2* (localizado em 19q13), levou a superexpressão protéica em 3% dos cânceres de mama e 15% dos cânceres de ovário (CHENG et al., 1992; BELLACOSA et al., 1995), a qual foi relacionada aos processos de invasão e metástases em câncer de mama e ovário (LYONS et al., 2003).

Mutações no gene supressor de tumor *PTEN*, localizado em 10q23.3, estão associadas a uma variedade de cânceres. No câncer de mama, a perda do gene é frequentemente associada com o fenótipo RE e RP negativos, sendo que foi observada a perda da proteína em 59% dos tumores de mama triplo negativos e apenas em 17% dos tumores RE e RP positivos (HU et al., 2009). A proteína PTEN atua na desfosforilação de PIP2 e PIP3, e seu papel fundamental parece ser a inibição da ativação de AKT dependente de PI3K.

Neste trabalho, utilizamos as técnicas de FISH e de PCR em tempo real para alterações do número de cópias. Os métodos de FISH e métodos baseados em PCR em tempo real vêm sendo utilizados empiricamente para confirmação dos resultados obtidos por CGH-*array* (HURST et al., 2004).

Nossos resultados de FISH foram concordantes com os de CGH-*array* em 13 das 20 análises (65,0%) para o gene *BP1* e em 11 (55%) para o gene *HER2*. Enquanto que a freqüência de concordância observada para estes genes está de acordo com o observado na literatura, a não concordância dos resultados entre as duas técnicas pode ser devido tanto a fatores intrinsecamente biológicos, como a fatores inerentes as técnicas como, por exemplo, os que se referem ao poder de resolução e “alvos” celulares. A análise por FISH é baseada em células individuais ou populações celulares específicas, onde se pode correlacionar diretamente o genótipo no tipo celular morfolologicamente definido. Em caso de alterações de baixa freqüência e clonalidade, estas podem não ser detectadas pela técnica de FISH,

considerando o número relativamente limitado de células analisadas (principalmente no caso das metástases no LNS, que são normalmente de pequeno tamanho e com as células tumorais infiltradas nos linfócitos). Este fator, no entanto, pode também ocorrer com o método de CGH-*array* que, ao contrário do FISH, analisa um pool de DNA tumoral que, mesmo microdissectado, pode apresentar populações celulares não-tumorais. Isso pode causar a incapacidade de detectar alterações tumorais de baixa frequência, por estas estarem “diluídas” no pool total de DNA, e portanto estarem abaixo do poder de resolução da técnica.

A validação por PCR em tempo real mostrou uma maior variação nos resultados, com uma baixa porcentagem de resultados concordantes. Os genes *BP1* e *HER2* foram os que apresentaram uma maior concordância entre as técnicas, 70,1% e 64,7% dos casos, respectivamente. Para o gene *AKT2*, a concordância ocorreu em 41,2% dos casos, seguido pelos genes *AKT1* e *FGFR2* em 29,4% dos casos. O gene *PIK3CA* apresentou 25,0% de concordância e o gene *PTEN* 11,8%. Considerando que o DNA utilizado para a análise de CGH-*array* e da PCR em tempo real foi o mesmo, essas diferenças provavelmente não podem ser explicadas em relação à composição celular (tumoral e/ou não-tumoral) do DNA analisado. Um dos fatores técnicos relevantes entre estes dois métodos, e que provavelmente pode ser responsável pelos resultados contraditórios, é o fato de que as regiões genômicas das sondas que estão plotadas na plataforma do CGH-*array* não apresentam necessariamente as mesmas sequências das sondas e *primers* utilizados na PCR em tempo real.

As discrepâncias entre os resultados de CGH-*array* e FISH/PCR em tempo real também podem ocorrer devido ao fato de que a análise no *array* avalia a razão relativa do número de cópias do DNA teste (tumor) vs. o DNA referência (amostra não-tumoral), e assim não fornece um número absoluto de cópias – como no caso do FISH e da PCR em tempo real (QIAO et al., 2007).

Para a correlação com genes envolvidos na tumorigênese mamária, analisamos em conjunto os resultados obtidos por CGH e CGH-*array*, para identificar as regiões mais comumente alteradas pelas duas técnicas. Nove regiões cromossômicas foram selecionadas, sendo uma em 8q, duas no cromossomo 11, uma em 16p, duas em 17q, uma em 20q, uma em 21q e uma em Xq. Devido a presença de um número elevado de genes alterados nessas regiões (tabela em

Anexo) realizamos uma triagem para selecionar genes previamente descritos com importância ao câncer de mama e ao processo metastático, como por exemplo, os genes *HER2*, *HRAS*, *RASSF7*, *IRF7*, *BAD* e *CCND1*.

Através das informações da plataforma *Gene*, do site *National Center for Biotechnology Information*, identificamos as funções e processos biológicos em que os genes selecionados estavam envolvidos. Essa análise resultou na identificação de mais de 50 funções/processos biológicos diferentes, muitas vezes específicos para cada gene. A maioria dos genes alterados (32%) estava envolvido com processos relacionados à tumorigênese e à metastatização mamária. Assim, as alterações cromossômicas mais comuns observadas neste trabalho se mostraram associadas a estes genes de relevância para a carcinogênese mamária. Mesmo as funções gênicas observadas em menor frequência estavam relacionadas ao câncer, como a migração e diferenciação celular, a regulação da angiogênese, senescência, entre outras.

Foram também identificados nessas regiões mais comumente alteradas a presença de diversos microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que regulam processos celulares e de desenvolvimento ao nível transcricional e traducional (GOTTE, 2010).

Os miRNAs encontram-se extensivamente desregulados em tecidos tumorais mamários quando comparados com tecidos normais. A expressão alterada e atividade desregulada dos miRNAs foram identificadas em diversos tipos de câncer (ISRAEL et al., 2009). Mais da metade dos genes para miRNAs estão localizados em regiões cromossômicas susceptíveis a ampliações, deleções ou translocações, significando que a expressão desses miRNAs pode ser alterada por essas alterações genéticas, que ocorrem principalmente durante o desenvolvimento tumoral (SHI et al., 2010).

No câncer de mama, a expressão de miRNAs está frequentemente desregulada. Ambas as atividades de supressão tumoral e oncogênica foram correlacionadas a miRNAs específicos, que modulam praticamente todos os estágios relevantes da progressão do câncer de mama, como proliferação de células tumorais, resistência à apoptose, migração celular, invasão e metástase, angiogênese e renovação de células-tronco tumorais (GOTTE, 2010). Dos microRNAs que apareceram nas regiões mais comumente alteradas em nosso estudo, dois vêm sendo relacionados ao câncer de mama. Um recente estudo

sugeriu o papel do miR-661 na progressão desse tipo de câncer, ao observar que este reprimia *MTA1* (*metastatic tumor antigen 1*) (REDDY et al., 2009). Em outro estudo, que quantificou transcritos de miRNAs em tumores mamários (185 tumores RE+ e 114 RE-), diversos microRNAs foram sugeridos como candidatos para marcadores prognósticos, entre eles o miRNA-210. Esse foi correlacionado com a agressividade tumoral em tumores primários de mama RE+ e LN- e também à recorrência precoce da doença em pacientes RE- e LN- (BAFFA et al., 2009). Além disso, foi relatado que a expressão do miR-210 pode ser induzida em resposta à hipoxia, que é uma das características do ambiente neoplásico. A expressão desse miRNA levou à redução de proteínas de reparo do DNA (CROSBY et al., 2009a, 2009b).

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 e linear, como o sugerido para a tumorigênese do câncer colorretal (VOGELSTEIN et al., 1988), não pode ser aplicado para a tumorigênese mamária.

Por outro lado, nossos resultados demonstram 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. 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. A avaliação de alterações de número de cópia pode identificar regiões cromossômicas e genes nelas situados com função importante no desenvolvimento e progressão das metástases axilares mamárias. Estes, poderão ser utilizados como marcadores moleculares auxiliando significativamente na detecção de células tumorais no LNS, o que é fundamental para a predição precoce de metástases e da recorrência da doença em pacientes com câncer de mama, além de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de determinação de fatores preditivos e prognósticos no câncer de mama. Os nossos dados demonstrando que das 25 alterações mais frequentes detectadas por CGH tanto nos tumores primários como nos linfonodos sentinela, 80% delas foram comuns a ambos os tecidos, e o mesmo sendo observado em 90% das informações obtidas por CGH-*array*, enfatizam o que por último foi considerado.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos na análise de tumores primários de câncer de mama e respectivas metástases nos linfonodos sentinela, concluímos que:

Alterações de número de cópias de DNA estão presentes nas metástases mamárias do linfonodo sentinela. Ganhos ou ampliações de regiões cromossômicas foram mais frequentes do que as perdas ou deleções, em ambas amostras tumorais.

Alterações cromossômicas compartilhadas foram observadas em 26 (86,7%) casos por CGH (23,7%), e em 5 (50,0%) casos (14,9%) por CGH-*array*.

A maior frequência de alterações cromossômicas observadas entre os casos, ou entre as amostras tumorais de um mesmo caso, foi de alterações não-compartilhadas (ou isoladas). Este resultado é esperado, e reflete a alta heterogeneidade genética que é característica das células tumorais mamárias, sugerindo uma possível divergência clonal em estágios iniciais da progressão tumoral, determinando a evolução independente dos clones celulares de tumores primários e de lesões metastáticas.

No entanto, as alterações mais frequentemente detectadas foram comuns a ambas as lesões analisadas e devem ser consideradas para a identificação de marcadores moleculares potencialmente capazes de informar sobre o prognóstico metastático de um tumor primário, admitindo-se que a metastatização é um evento que já pode ser determinado geneticamente no tumor primário.

Nas regiões cromossômicas alteradas nos casos analisados no presente estudo, estão mapeados genes envolvidos na proliferação e/ou diferenciação da célula mamária, que atuam principalmente nos processos biológicos de regulação da transcrição do DNA e da proliferação celular, transdução de sinal, apoptose, resposta ao estresse e a danos, reparo do DNA e regulação do ciclo celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RASOOL, S.; KIDSON, S.H.; PANIERI, E.; DENT, D.; PILLAY, K.; HANEKOM, G.S. 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.; BONDESON, L.; GARNE, J.P.; BORG, A.; BALDETORP, B.; PANDIS, N. 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.

AHR, A.; HOLTRICH, U.; SOLBACH, C.; SCHARL, A.; STREBHARDT, K.; KARN, T.; KAUFMANN, M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. **Journal of Pathology**, v. 195, p. 312-320, 2001.

AIHARA, T.; FUJIWARA, Y.; OOKA, M.; SAKITA, I.; TAMAKI, Y.; MONDEN, M. Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 58, p. 137-140, 1999.

ALBERTSON, D.G. Gene amplification in cancer. **Trends in Genetics**, v. 22, p. 447-455, 2006.

ARBOLEDA, M.J.; LYONS, J.F.; KABBINAVAR, F.F.; BRAY, M.R.; SNOW, B.E.; AYALA, R.; DANINO, M.; KARLAN, B.Y.; SLAMON, D.J. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. **Cancer Research**, v.63(1), p.196-206, 2003.

AUBELE, M.; MATTIS, A.; ZITZELSBERGER, H.; WALCH, A.; KREMER, M.; WELZL, G.; HÖFLER, H.; WERNER, M. Extensive ductal carcinoma In situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. **International Journal of Cancer**, v. 85, p. 82-86, 2000.

AUBELE, M.; AUER, G.; NÄHRIG, J.; ZITZELSBERGER, H.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; SMIDA, J.; WALCH, A.; HÖFLER, H.; WERNER, M. Chromosomal imbalances are associated with metastasis-free survival in breast cancer patients. **Analytical Cellular Pathology**, v. 24, p. 77-87, 2002.

BAFFA, R.; FASSAN, M.; VOLINIA, S.; O'HARA, B.; LIU, C. G.; PALAZZO, J. P.; *et al.* MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. **The Journal of Pathology**, v. 219, p. 214-221, 2009.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics**, vol. 33, 2003.

BECKMANN, M.W.; NIEDERACHER, H.G.; BODDEN-HEIDRICH, R.; GOECKE, T.O.; KUSCHEL, B.; ACHNOULA, M.; ABA, F.; SCHNÜRCH, H.G.; BENDER, H.G. 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.

BELLACOSA, A.; DE FEO, D.; GODWIN, A.K.; BELL, D.W.; CHENG, J.Q.; ALTOMARE, D.A.; WAN, M.; DUBEAU, L.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; FERRANDINA, G.; BENEDETTI PANICI, P.; MANCUSO, S.; NERI, G.; TESTA, J.R. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. **International Journal of Cancer**, v.64(4), p.280-5, 1995.

BERNARDINO, J.; GERBAULT-SEUREAU, M.; SASTRE, X.; DUTRILLAUX, B. 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.

BERTUCCI, F.; HOULGATTE, R.; GRANJEAUD, S.; NASSER, V.; LORIOD, B.; BEAUDOING, E.; HINGAMP, P.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; BIRNBAUM, D.; NGUYEN, C. Prognosis of breast cancer and gene expression profiling using DNA arrays. **Annals of the New York Academy of Science**, v.975, p. 217-231, 2002.

BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; ROUGEMONT, J.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; CERVERA, N.; TRPIN, C.; NGUYEN, C.; XERRI, L.; HOULGATTE, R.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; BIRNBAUM, D. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 65(6), p. 2170-8, 2005.

BLUMENCRANZ, P.; WHITWORTH, P.W.; DECK, K.; ROSENBERG, A.; REINTGEN, D.; BEITSCH, P.; CHAGPAR, A.; JULIAN, T.; SAHA, S.; MAMOUNAS, E.; GIULIANO, A.; SIMMONS, R. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. **American Journal of Surgery**, v. 194, p. 426-432, 2007.

BOLLET, M.A.; KIROVA, Y.M.; ANTONI, G.; PIERGA, J.Y.; SIGAL-ZAFRANI, B.; LAKI, F.; CAMPANA, F.; DENDALE, R.; SALMON, R.; COTTU, P.; FOURQUET, A. Responses to concurrent radiotherapy and hormone-therapy and outcome for large breast cancers in post-menopausal women. **Radiotherapy and Oncology**, v. 85, p. 336-345, 2007.

BOSTICK, P.J.; HUYNH, K.T.; SARANTOU, T.; TURNER, R.R.; QI, K.; GIULIANO, A.E.; HOON, D.S. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. **International Journal of Cancer**, v. 79, p. 645-651, 1998.

BOYLE, P.; LEON M.E.; MAISONNEEVE, P.; AUTIER, P. Cancer control in women. Update 2003. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 83 (1), p. 179-202, 2003.

BRESLIN, T.M.; COHEN, L.; SAHIN, A.; FLEMING, J.B.; KUERER, H.M.; NEWMAN, L.A.; DELPASSAND, E.S.; HOUSE, R.; AMES, F.C.; FEIG, B.W.; ROSS, M.I.; SINGLETARY, S.E.; BUZDAR, A.U.; HORTOBAGYI, G.N.; HUNT, K.K. Sentinel lymph node biopsy is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 3480-3486, 2000.

BUSH, N.J. Advances in hormonal therapy for breast cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 23, p. 46-54, 2007.

CAMPBELL, R.A.; BHAT-NAKSHATRI, P.; PATEL, N.M.; CONSTANTINIDOU, D.; ALI, S.; NAKSHATRI, H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276(13), p.9817-24, 2001.

CAMPBELL, I.G.; RUSSELL, S.E.; CHOONG, D.Y.; MONTGOMERY, K.G.; CIAVARELLA, M.L.; HOOI, C.S.; CRISTIANO, B.E.; PEARSON, R.B.; PHILLIPS, W.A. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. **Cancer Research**, v. 21, p. 7678-81, 2004.

CAVALLI, L.R. Molecular markers of breast axillary lymph node metastasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 9, p. 441-454, 2009.

CAVALLI, L.R.; MAN, Y.G.; SCHWARTZ, A.M.; RONE, J.D.; ZHANG, Y.; URBAN, C.A.; LIMA, R.S.; HADDAD, B.R.; BERG, P.E. Amplification of the BP1 homeobox gene in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 187, p. 19-24, 2008.

CAVALLI, L.R.; URBAN, C.A.; DAI, D.; DE ASSIS, S.; TAVARES, D.C.; RONE, J.D.; BLEGGI-TORRES, L.F.; LIMA, R.S.; CAVALLI, I.J.; ISSA, J.P.; HADDAD, B.R. 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.

CHASE, M.B.; FU, S.; HAGA, S.B.; DAVENPORT, G.; STEVENSON, H.; DO, K.; MORGAN, D.; MAH, A.L.; BERG, P.E. BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the beta-globin gene. **Molecular Cell Biology**, v. 22, p. 2505-2514, 2002.

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, S.L.; HOEHNE, F.M.; GIULIANO, A.E. The prognosis of micrometastasis in breast cancer: a SEER population-based analysis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, p. 3378-3384, 2007.

CHEN, F.; LV, M.; XUE, Y.; ZHOU, J.; HU, F.; CHEN, X.; ZHAO, Z.; LI, Y.; WANG, X. Genetic variants of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) are associated with breast cancer risk in Chinese women of the Han nationality. **Immunogenetics**, epub Agosto 2011.

CHENG, J.Q.; GODWIN, A.K.; BELLACOSA, A.; TAGUCHI, T.; FRANKE, T.F.; HAMILTON, T.C.; TSICHLIS, P.N.; TESTA, J.R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.89(19), p.9267-71, 1992.

CHIN, S.F.; TESCHENDORFF, A.E.; MARIONI, J.C.; WANG, Y.; BARBOSA-MORAIS, N.L.; THORNE, N.P.; COSTA, J.L.; PINDER, S.E.; VAN DE WIEL, M.A.; GREEN, A.R.; ELLIS, I.O.; PORTER, P.L.; TAVARE, S.; BRENTON, J.D.; YLSTRA, B.; CALDAS, C. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. **Genome Biology**, v. 8, 2007

CHRISTIANSEN, P.; FRISS, E.; BALSLEV, E.; JENSEN, D.; MOLLER, S.; DANISH BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP. Sentinel node biopsy in breast cancer: five years experience from Denmark. **Acta Oncologica**, v. 47, p. 561-568, 2008.

CHUNG, M.A.; STEINHOFF, M.M.; CADY, B. 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.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R.C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncology**, v. 8, p. 235-44, 2007.

CLIMENT, J.; MARTINEZ-CLIMENT, J.A.; BLESÁ, D.; GARCIA-BARCHINO, M.J.; SAEZ, R.; SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D.; AZAGRA, P.; LLUCH, A.; GARCIA-CONDE, J. Genomic loss of 18p predicts an adverse clinical outcome in patients with high-risk breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 3863-3869, 2002.

CLIMENT, J.; GARCIA, J.L.; MAO, J.H.; ARSUAGA, J.; PEREZ-LOSADA, J. Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, p. 497-508, 2007.

COLLEONI, M.; ROTMENSZ, N.; MAISONNEUVE, P.; SONZOGNI, A.; PRUNERI, G.; CASADIO, C.; LUINI, A.; VERONESI, P.; INTRA, M.; GALIMBERTI, V.; TORRISI, R.; ANDRIGHETTO, S.; GHISINI, R.; GOLDBIRSCH, A.; VIALE, G. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, p. 1632-1640, 2007.

COLLINS, J.A.; BLAKE, J.M.; CROSIGNANI, P.G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reprod. Update**, v.11 (6), p.545-560, 2005.

CREMER, T.; LANDEGENT, J.; BRUCKNER, A.; SCHOLL, H.P.; SCHARDIN, M.; HAGER, H.D.; DEVILEE, P.; PEARSON, P.; VAN DER PLOEG, M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and nonradioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1-84. **Human Genetics**, v.74, p.346-352, 1986.

CROSBY, M. E.; DEVLIN, C. M.; GLAZER, P. M.; CALIN, G. A.; IVAN, M. Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 3861–3866, 2009.

CROSBY, M. E.; KULSHRESHTHA, R.; IVAN, M.; GLAZER, P. M. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. **Cancer Research**, v. 69, p. 1221–1229, 2009.

DABBS, D.J.; FUNG, M.; LANDSITTEL, D.; MCMANUS, K.; JOHNSON, R. Sentinel lymph node micrometastasis as a predictor of axillary tumor burden. **Breast Journal**, v. 10, p. 101-105, 2004.

DAVIES, J.J.; WILSON, I.M.; LAM, W.L. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. **Chromosome Research**, v. 13, p. 237-48, 2005.

DELLAS, A.; TORHORST, J.; SCHILTHEISS, E.; MIHATSCH, M.J.; MOCH, H. DNA sequence losses on chromosomes 11p and 18q are associated with clinical outcome in lymph node-negative ductal breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1210-1216, 2002.

DOWLATSHAHI, K.; FAN, M.; SNIDER, H.C.; HABIB, F.A. Lymph node micrometastases from breast carcinoma: reviewing the dilemma. **Cancer**, v. 80, p. 1188-1197, 1997.

DOWLATSHAHI, K.; FAN, M.; ANDERSON, J.M.; BLOOM, K.J. Occult metastases in sentinel lymph nodes of 200 patients with operable breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 8, p. 675-681, 2001.

DRIOUCH, K.; LANDEMAINE, T.; SIN, S.; WANG, S.; LIDEREAU, R. Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.24, p. 575-585, 2007.

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.

EJLERTSEN, B.; JENSEN, M.B.; NIELSEN, K.V.; BALSLEV, E.; RASMUSSEN, B.B.; WILLEMOE, G.L.; HERTEL, P.B.; KNOOP, A.S.; MOURIDSEN, H.T.; BRÜNNER, N. HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing

chemotherapy in high-risk breast cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p.984-990, 2010.

ERVEN, K.; VAN LIMBERGEN, E. Regional lymph node irradiation in breast cancer. **Future Oncology**, v. 3, p. 343-352, 2007.

ESTOURGIE, S.H.; TANIS, P.J.; NIEWEG, O.E.; VALDÉS OLMOS, R.A.; RUTGERS, E.J.; KROON, B.B. 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.

ESWARAKUMAR, V.P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 139-149, 2005.

FANG, M.; TOHER, J.; MORGAN, M.; DAVISON, J.; TANNENBAUM, S.; CLAFFEY, K. Genomic differences between estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative human breast carcinoma identified by single nucleotide polymorphism array comparative genome hybridization analysis. **Cancer**, v. 117, p. 2024-2034, 2011.

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.

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

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.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L.; PIANOVSKY, M.A.; GIATZAKIS, C.; YOUNG, H.M.; HADDAD, B.R. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 84, p.1116-1121, 1999.

FINEK, J.; HOLUBEC, L. J.R.; TOPOLCAN, O.; ELGROVA, L.; SKALOVA, A.; PECEN, L. The importance of prognostic factors in premenopausal women with breast cancer. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1893-1896, 2007.

FOROZAN, F.; KARHU, R.; KONONEN, J.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P. Genome screening by comparative genomic hybridization. **Trends in Genetics**, v. 13, p. 405-409, 1997.

FORTUNATO, L.; AMINI, M.; COSTARELLI, L.; PIRO, F.R.; FARINA, M.; VITELLI, C.E. A standardized sentinel lymph node enhanced pathology protocol (SEEP) in patients with breast cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 96, p. 470-473, 2007.

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

FRIEDRICH, K.; WEBER, T.; SCHEITHAUER, J.; MEYER, W.; HAROSKE, G.; KUNZE, K.D.; BARETTON, G. Chromosomal genotype in breast cancer progression: comparison of primary and secondary manifestations. **Cellular Oncology**, v. 30, p. 39-50, 2008.

FU, S.W.; SCHWARTZ, A.; STEVENSON, H.; PINZONE, J.J.; DAVENPORT, G.J.; ORENSTEIN, J.M.; GUTIERREZ, P.; SIMMENS, S.J.; ABRAHAM, J.; POOLA, I.; STEPHAN, D.A.; BERG, P.E. Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 5, p. 82-87, 2003.

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.

FUKINO, K.; IIDO, A.; TERAMOTO, A.; SAKAMOTO, G.; KASUMI, F.; NAKAMURA, Y.; EMI, M. Frequent allelic loss at the TOC locus on 17q25.1 in primary breast cancers. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 24, p. 345-350, 1999.

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.

GALLAGHER, E.; MC GOLDRICK, A.; CHUNG, W.Y.; MC CORMACK, O.; HARRISON, M.; KERIN, M.; DERVAN, P.A.; MC CANN, A. Gain of imprinting of SLC22A18 sense and antisense transcripts in human breast cancer. **Genomics**, v. 88, p. 12-17, 2006.

GAO, Y.; NIU, Y.; WANG, X.; WEI, L.; LU, S. Genetic changes at specific stages of breast cancer progression detected by comparative genomic hybridization. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, p. 145-152, 2009.

GAO, Y.; NIU, Y.; WANG, X.; WEI, L.; ZHANG, R.; LV, S.; YU, Q.; YANG, X. Chromosome aberrations associated with centrosome defects: a study of comparative genomic hybridization in breast cancer. **Human Pathology**, epub April/2011.

GIPPONI, M.; CANAVESE, G.; LIONETTO, R.; CATTURICH, A.; VECCHIO, C.; SAPINO, A.; FRIEDMAN, D.; CAFIERO, F. The role of axillary lymph node dissection in breast cancer patients with sentinel lymph node micrometastases. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 32, p. 143-147, 2006.

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

GIULIANO, A.E.; DALE, P.S.; TURNER, R.R.; MORTON, D.L.; EVANS, S.W.; KRASNE, D.L. 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 Surgery Oncologic**, v. 62, p.75-77, 1996.

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

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

GIULIANO, A.E.; HAIGH, P.I.; BRENNAN, M.B.; HANSEN, N.M.; KELLEY, M.C.; YE, W.; GLASS, E.C.; TURNER, R.R. 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.

GIULIANO, A.E.; HUNT, K.K.; BALLMAN, K.V.; BEITSCH, P.D.; WHITWORTH, P.W.; BLUMENCRANZ, P.W.; LEITCH, A.M.; SAHA, S.; McCALL, L.M.; MORROW, M. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 305, p. 569-75, 2011.

GOLSHAN, M.; MARTIN, W.J.; DOWLATSHAHI, K. 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.

GÖTTE, M. MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. **Minerva Gynecology**, v. 62, p. 559-571, 2010.

GOYAL, A.; MANSEL, R.E. Recent advances in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, p. 621-626, 2008.

GRABAU, D. Breast cancer patients with micrometastases only: is a basis provided for tailored treatment? **Surgical Oncology**, v. 17, p. 211-217, 2008.

GUENTHER, J.M.; HANSEN, N.M.; DIFRONZO, L.A.; GIULIANO, A.E.; COLLINS, J.C.; GRUBE, B.L.; O'CONNELL, T.X. Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. **Archives of Surgery**, v. 138, p. 52-56, 2003.

GUSTIN, J.P.; COSGROVE, D.P.; PARK, B.H. The PIK3CA gene as a mutated target for cancer therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, p.733-40, 2008.

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.

HAN W.; HAN, M.R.; KANG, J.J.; BAE, J.Y.; LEE, J.H.; BAE, Y.J.; LEE, J.E.; SHIN, H.J.; HWANG, K.T.; HWANG, S.E.; KIM, S.W.; NOH, D.Y. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in

tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **BMC Cancer**, v. 6, p. 92, 2006.

HAN, S.; PARK, K.; SHIN, E.; KIM, H.J.; KIM, J.Y.; KIM, J.Y.; GWAK, G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. **Oncology Report**, v. 24, p. 121-128, 2010.

HARADA, H.; NAGAI, H.; TSUNEIZUMI, M.; MIKAMI, I.; SUGANO, S.; EMI, M. Identification of DMC1, a novel gene in the TOC region on 17q25.1 that shows loss of expression in multiple human cancers. *Journal of Human Genetics*, v. 46, p. 90-95, 2001.

HAVERTY, P.M.; FRIDLAND, J.; LI, L.; GETZ, G.; BEROUKHIM, R.; LOHR, S.; WU, T.D.; CAVET, G.; ZHANG, Z.; CHANT, J. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. **Genes, chromosomes and cancer**, v. 47, p. 530-542, 2008.

HAYES, D.F. Prognostic and predictive factors revisited. **Breast**, v. 14, P. 493-499, 2005.

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.

HERY, M; DELOZIER, T.; RAMAIOLI, A.; JULIEN, J.P.; DE LAFONTAN, B.; PETIT, T.; DE GHISLAIN, C.; WEBER, B.; BONNETERRE, J.; TEISSIER, E. Natural history of node-negative breast cancer: are conventional prognostic factors predictors of time to relapse? **The breast J**, v. 11, p. 442-448, 2002.

HU, X.; STERN, H.M.; GE, L.; O'BRIEN, C.; HAYDU, L.; HONCHELL, C.D.; HAVERTY, P.M.; PETERS, B.A.; WU, T.D.; AMLER, L.C.; CHANT, J.; STOKOE, D.; LACKNER, M.R.; CAVET, G. Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. **Molecular Cancer Research**, v. 7, p. 511-522, 2009.

HUNGERMANN, D.; SCHMIDT, H.; NATRAJAN, R.; TIDOW, N.; POOS, K.; REIS-FILHO, J.S.; BRANDT, B.; BUERGER, H.; KORSCHING, E. Influence of whole arm loss of chromosome 16q on gene expression patterns in oestrogen receptor-positive, invasive breast cancer. **Journal of Pathology**, v. 224, p. 517-528, 2011.

HUNTER, K.W.; ALSARRAJ, J. Gene expression profiles and breast cancer metastasis: a genetic perspective. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 26, p. 497-503, 2009.

HURST, C.D.; FIEGLER, H.; CARR, P.; WILLIAMS, S.; CARTER, N.P.; KNOWLES, M.A. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. **Oncogene**, v. 23, p. 2250-2260, 2004.

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.

HWANG, K.T.; HAN, W.; CHO, J.; LEE, J.W.; KO, E.; KIM, E.K.; JUNG, S.Y.; JEONG, E.M.; BAE, J.Y.; KANG, J.J.; YANG, S.J.; KIM, S.W.; NOH, D.Y. Genomic copy number alterations as predictive markers of systemic recurrence in breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1807-1815, 2008.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: Março de 2011.

INGVARSSON, S. Genetics of breast cancer. **Drugs Today**, v. 40, p. 991-1002, 2004.

ISOLA, J.J.; KALLIONIEMI, O.P.; CHU, L.W.; FUQUA, S.A.; HILSENBECK, S.G.; OSBORNE, C.K.; WALDMAN, F.M. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *American Journal of Pathology*, v. 147, p. 905-911, 1995.

ISRAEL, A.; SHARAN, R.; RUPPIN, E.; GALUN, E. Increased microRNA activity in human cancers. **PLoS ONE**, v. 4, p. 6045, 2009.

JOHNSON, N.A.; HAMOUDI, R.A.; ICHIMURA, K.; LIU, L.; PEARSON, D.M.; COLLINS, V.P.; DU, M.Q. Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, p. 968-978, 2006.

JOHNSON, N.; SPEIRS, V.; CURTIN, N.J.; HALL, A.G. A comparative study of genome-wide SNP, CGH microarray and protein expression analysis to explore genotypic and phenotypic mechanisms of acquired antiestrogen resistance in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, p. 55-63, 2008.

JONES, S.; CHEN, W.D.; PARMIGIANI, G.; et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 105, p. 4283-4288, 2008.

JULIAN, T.B.; BLUMENCRANZ, P.; DECK, K.; WHITWORTH, P.; BERRY, D.A.; BERRY, S.M.; ROSENBERG, A.; CHAGPAR, A.B.; REINTGEN, D.; BEITSCH, P.; SIMMONS, R.; SAHA, S.; MAMOUNAS, E.P.; GIULIANO, A. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 3338-3345, 2008.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v.258, p.818-821, 1992.

KALLIONIEMI, O.P.; KALLIONIEMI, A.; KURISU, W.; et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 5321–5325, 1992.

KALLIONIEMI, O. P. ; KALLIONIEMI, A.; PIPER, J.; ISOLA, J.; WALDMAN, F.M.; GRAY, J.W.; PINKEL, D. 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.

KANG, S; BADER, AG; VOGT, PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 102, p. 802-807, 2005.

KAPP, A.V.; JEFFREY, S.S.; LANGERØD, A.; BØRRESEN-DALE, A.L.; HAN, W.; NOH, D.Y.; BUKHOLM, I.R.; NICOLAU, M.; BROWN, P.O.; TIBSHIRANI, R. Discovery and validation of breast cancer subtypes. **BMC Genomics**, v. 7, p. 231, 2006.

KARAKAS, B.; BACHMAN, K.E.; PARK, B.H. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **British Journal of Cancer**, v. 94(4), p.455-9, 2006.

KARLSSON, E.; DANIELSSON, A.; DELLE, U.; OLSSON, B.; KARLSSON, P.; HELOU, K. Chromosomal changes associated with clinical outcome in lymph node-negative breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 172, p. 139-146, 2007.

KATOH, M. Genetic alterations of FGF receptors: an emerging field in clinical cancer diagnostics and therapeutics. **Expert Review Anticancer Therapy**, v. 10, p. 1375-1379, 2010.

KATOH, M.; TERADA, M. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Gastric Cancer**, p.196-208, 1993.

KIM, T.; GIULIANO, A.E.; LYMAN, G.H. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma. **Cancer**, v. 106, p. 4-16, 2005.

KING, C.R.; KRAUS, M.H.; AARONSON, S.A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. **Science**, v. 229, p. 974–976, 1985.

KIRKEGAARD, T.; WITTON, C.J.; EDWARDS, J.; NIELSEN, K.V.; JENSEN, L.B.; CAMPBELL, F.M.; COOKE, T.G.; BARTLETT, J.M. Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH. **Histopathology**, v. 56 p. 203-11, 2010.

KRAG, D.N.; WEAVER, D.L. Pathological and molecular assessment of sentinel lymph nodes in solid tumors. **Seminars in Oncology**, 29: 274-279. 2002.

KRAUSS, G. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**, 4^a edição, Alemanha: Wiley-VCH, 2008.

KOKKE, M.C.; JANNINK, I.; BARNEVELD, P.C.; VAN DER LINDEN, J.C.; GELDERMAN, W.A.; WISSING, J.C.; BOSSCHA, K. 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.

KUUKASJARVI, T.; KARHU, R.; TANNER, M.; KÄHKÖNEN, M.; SCHÄFFER, A.; NUPPONEN, N.; PENNANEN, S.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; ISOLA, J. 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.; PENNANEN, S.; KARHU, R.; KALLIONIEMI, O.P.; ISOLA, J. Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. **American Journal of Pathology**, v.150, p.1465-1471, 1997b.

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.; TUKIAINEN, E.; VON SMITTEN, K. 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.

LIBERMAN, L. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 971-977, 2000.

LINDHAL, T.; ENGEL, G.; AHLGREN, J.; KLAAR, S.; BJÖHLE, J.; LINDMAN, H.; ANDERSSON, J.; VON SCHOULTZ, E.; BERGH, J. 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, X.; LU, X.; WANG, Z.C.; IGLEHART, J.D.; ZHANG, X.; RICHARDSON, A.L. Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.108, p.191-201, 2008.

LUCCI, A.; MCCALL, L.M.; BEITSCH, P.D.; WHITWORTH, P.W.; REINTGEN, D.S.; BLUMENCRANZ, P.W.; LEITCH, A.M.; SAHA, S.; HUNT, K.K.; GIULIANO, A.E. Surgical Complications Associated With Sentinel Lymph Node Dissection (SLND) Plus Axillary Lymph Node Dissection Compared With SLND Alone in the American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0011. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 3657-3663, 2007.

MABRY, H.; GIULIANO, A.E. Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 16, p. 55-70, 2007.

MAN, Y.G.; FU, S.W.; PINZONE, J.J.; SCHWARTZ, A.M.; SIMMENS, S.J.; BERG, P.E. Expression of BP1, a homeobox gene, correlates with progression and invasion of mammary ductal carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 90, p. 241-247, 2005.

MAN, Y.G.; SCHWARTZ, A.; LEVINE, P.H.; TEAL, C.; BERG, P.E. BP1, a putative signature marker for inflammatory breast cancer and tumor aggressiveness. **Cancer Biomarkers**, v. r, p. 9-17, 2009.

MANGIA, A.; CHIARAPPA, P.; TOMMASI, S.; CHIRIATTI, A.; PETRONI, S.; SCHITTULLI, F.; PARADISO, A. Genetic heterogeneity by comparative genomic hybridization in BRCAx breast cancers. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 182, p. 75-83, 2008.

MANSEL, R.E.; GOYAL, A.; DOUGLAS-JONES, A.; WOODS, V.; GOYAL, S.; MONYPENNY, I.; SWEETLAND, H.; NEWCOMBE, R.G.; JASANI, B. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-operative real time GeneSearchtrade mark BLN assay in the operating room: results of the Cardiff study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.115, p. 595-600, 2009.

MANZOTTI M.; DELL'ORTO, P.; MAISONNEUVE, P.; ZURRIDA, S.; MAZZAROL, G.; VIALE, G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases lymph nodes. **International Journal of Cancer**, v. 95, p. 307-312, 2001.

MARINHO, V.F.; METZE, K.; SANCHES, F.S.; ROCHA, G.F.; GOBBI, H. Molecular features of breast cancer predictive of lymph node metastases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, p. 203-207, 2008.

MARTIN, A.J.; GRANT, A.; ASHFIELD, A.M.; PALMER, C.N.; BAKER, L.; QUINLAN, P.R.; PURDIE, C.A.; THOMPSON, A.M.; JORDAN, L.B.; BERG, J.N. FGFR2 protein expression in breast cancer: nuclear localisation and correlation with patient genotype. **BMC Research Notes**, v. 21, p. 4-72, 2011.

McCALL, P.; GEMMELL, L.K.; MUKHERJEE, R.; BARTLETT, J.M.; EDWARDS, J. Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 98(6), p.1094-101, 2008.

MIKAMI, I.; HARADA, H.; NAGAI, H.; TSUNEIZUMI, M.; NOBE, Y.; KOIZUMI, K.; SUGANO, S.; TANAKA, S.; EMI, M. Down-regulation in multiple human cancers of a novel gene, DMHC, from 17q25.1 that encodes an integral membrane protein. **Japan Journal of Cancer Research**, v. 92, p. 417-422, 2001.

MIN, C.J.; TAFRA, L.; VERBANAC, K.M. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. **Cancer Research**, v. 58, p. 4581-4584, 1998.

MOFFA, A.B.; TANNHEIMER, S.L.; ETHIER, S.P. Transforming potential of alternatively spliced variants of FGFR2 in human mammary epithelial cells. **Molecular Cancer Research**, v. 2, p. 643-652, 2004.

MONTAGNA, C.; LYU, M.S.; HUNTER, K.; LUKES, L.; LOWTHER, W.; REPERT, T.; HISSONG, B.; WEAVER, Z.; RIED, T. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 63, p. 2179-2187, 2003.

MONTAGNA, E.; VIALE, G.; ROTMENSZ, N.; MAISONNEUVE, P.; GALIMBERTI, V.; LUINI, A.; INTRA, M.; VERONESI, P.; MAZZAROL, G.; PRUNERI, G.; RENNE, G.; TORRISI, R.; CARDILLO, A.; CANCELLO, G.; GOLDBIRSCH, A.; COLLEONI, M. Minimal axillary lymph node involvement in breast cancer has different prognostic implications according to the staging procedure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, p. 385-394, 2009.

MORGENSZTERN, D.; MCLEOD, H.L. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. **Anticancer Drugs**, v.16, p. 797-803, 2005.

MORRIS, C.M.; HAATAJA, L.; MCDONALD, M.; GOUGH, S.; MARKIE, D.; GROFFEN, J.; HEISTERKAMP, N. The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours. **Cytogenetics, Cell and Genetics**, v. 89, p. 18-23, 2000.

MOTOMURA, K.; KOMOIKE, Y.; INAJI, H.; HASEGAWA, Y.; KASUGAI, T.; NOGUCHI, S.; KOYAMA, H. Multiple sectioning and immunohistochemical staining of sentinel nodes in patients with breast cancer. **British Journal of Surgery**, v. 89, p. 1032-1034, 2002.

MULERIS, M.; ALMEIDA, A.; GERBAULT-SEUREAU, M.; MALFOY, B.; DUTRILLAUX, B. Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 10, p. 160-170, 1994.

NAGATA, Y.; LAN, K.H.; ZHOU, X.; TAN, M.; ESTEVA, F.J.; SAHIN, A.A. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. **Cancer Cell**, v. 6, p. 117-127. 2004.

NAHRIG, J.; RUCHTER, T.; KOWOLIK, J.; KUHN, W.; AVRIL, N.; HÖFLER, H.; WERNER, M. Comparison of different histopathological methods for the examination of sentinel lymph nodes in breast cancer. **Anticancer Research**, v. 20 (3B), p. 2209, 2000.

NAIK, A.M.; FEY, J.; GEMIGNANI, M.; HEERDT, A.; MONTGOMERY, L.; PETREK, J.; PORT, E.; SACCHINI, V.; SCLAFANI, L.; VANZEE, K.; WAGMAN, R.; BORGAN, P.I.; CODY, H.S. 3RD. 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.

NATHANSON, S.D.; SLATER, R.; DEBRUYN, D.; KAPKE, A.; LINDEN, M. Her-2/neu expression in primary breast cancer with sentinel lymph node metastasis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 13, p. 205-213, 2006.

NAYLOR, T.L.; GRESHOCK, J.; WANG, Y.; COLLIGON, T.; YU, Q.C.; CLEMMER, V.; ZAKS, T.Z.; WEBER, B.L. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 1186-1198, 2005.

NESSLING, M.; RICHTER, K.; SCHWAENEN, C.; ROERIG, P.; WROBEL, G.; WESSENDORF, S.; FRITZ, B.; BENTZ, M.; SINN, H.P.; RADLWIMMER, B.; LICHTER, P. Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. **Cancer Research**, v. 65, p. 439-447, 2005.

NEUMAIER, M.; GERHARD, M.; WAGENER, C. Diagnosis of micrometastases by amplification of tissue-specific genes. **Gene**, v. 159, p. 43-47, 1995.

NISHIZAKI, T.; DEVRIES, S.; CHEW, K.; GOODSON, W.H. 3RD.; LJUNG, B.M.; THOR, A.; WALDMAN, F.M. 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.

NOWEL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 1, p. 23-28, 1976.

NYATI MK, MORGAN MA, FENG FY, LAWRENCE TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. **Nature Reviews in Cancer**, v. 6(11), p. 876-85, 2006.

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

PANDIS, N.; BARDI, G.; JIN, Y.; DIETRICH, C.; JOHANSSON, B.; ANDERSEN, J.; MANDAHL, N.; MITELMAN, F.; HEIM, S. 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.; ADEYINKA, A.; RIZOU, H.; BARDI, G.; MERTENS, F.; ANDERSEN, J.A.; BONDESON, L.; SFIKAS, K.; QVIST, H.; APOSTOLIKAS, N.; MITELMAN, F.; HEIM, S. Cytogenetic comparison of primary tumors and lymphonode metastases in breast cancer patients. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.22, p. 122-129, 1998.

PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, v. 168, p. 1356-1358, 1970.

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

PARRIS, T.Z.; DANIELSSON, A.; NEMES, S.; KOVÁCS, A.; DELLE, U.; FALLENIIUS, G.; MÖLLERSTRÖM, E.; KARLSSON, P.; HELOU, K. Clinical implications of gene dosage and gene expression patterns in diploid breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 3860-3874, 2010.

PARSA, S.; RAMASAMY, S.K.; DE LANGHE, S.; GUPTE, V.V.; HAIGH, J.J.; MEDINA, D.; BELLUSCI, S. Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. **Developmental Biology**, v. 317, p. 121-131, 2008.

PATERSON, A.L.; POLE, J.C.; BLOOD, K.A.; *et al.* Co-amplification of 8p12 and 11q13 in breast cancers is not the result of a single genomic event. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 46, p. 427-439, 2007.

PEINTINGER, F.; REITSAMER, R.; STRANZL, H.; RALPH, G. 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.

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

PETTINATO, G.; MANIVEL, C.J.; PANICO, L.; SPARANO, L.; PETRELLA, G. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, p. 857-866, 2004.

PETTY, E.M.; MILLER, D.E.; GRANT, .A.L; COLLINS, E.E.; GLOVER, T.W.; LAW, D.J. FISH localization of the soluble thymidine kinase gene (TK1) to human 17q25, a region of chromosomal loss in sporadic breast tumors. **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 72, p. 319-321, 1996.

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

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.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1976.

PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; KUO, W.L.; CHEN, C.; ZHAI, Y.; DAIRKEE, S.H.; LJUNG, B.M.; GRAY, J.W.; ALBERTSON, D.G. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nature Genetics**, v.20, p.207-211, 1998.

POLLACK, J.R.; PEROU, C.M.; ALIZADEH, A.A.; EISEN, M.B.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.F.; JEFFREY, S.S.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. **Nature Genetics**, v. 23, p. 41-46, 1999.

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

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 3155-3163, 2007.

POPŁAWSKI, A.B.; JANKOWSKI, M.; ERICKSON, S.W.; DÍAZ DE STÅHL, T.; PARTRIDGE, E.C.; CRASTO, C.; GUO, J.; GIBSON, J.; MENZEL, U.; BRUDER, C.E.; KACZMARCZYK, A.; BENETKIEWICZ, M.; ANDERSSON, R.; SANDGREN, J.; ZEGARSKA, B.; BAŁA, D.; SRUTEK, E.; ALLISON, D.B.; PIOTROWSKI, A.; ZEGARSKI, W.; DUMANSKI, J.P. Frequent genetic differences between matched primary and metastatic breast cancer provide an approach to identification of biomarkers for disease progression. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 560-568, 2010.

QIAO, Y.; LIU, X.; HRVARD, C.; NOLIN, S.L.; BROWN, W.T.; KOOCHEK, M.; HOLDEN, J.J.A.; LEWIS, M.E.S.; RAJCAN-SEPAROVIC, E. Large-scale copy number variants (CNVs): distribution in normal subjects and FISH/real-time qPCR analysis. **BMC Genomics**, v. 8, p. 167-178, 2007.

RAMASWAMY, S.; ROSS, K.N.; LANDER, E.S.; GOLUB, T.R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nature Genetics**, v. 33, p. 49-54, 2003.

RAMPAUL, R. S.; MIREMADI, A.; PINDER, S.E.; LEE, A.; ELLIS, I.O. Pathological validation and significance of micrometastasis in sentinel nodes in primary breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 3(2), p. 113-116, 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.

REDDY, S. D.; PAKALA, S. B.; OHSHIRO, K.; RAYALA, S. K.; KUMAR, R. MicroRNA-661, a c/EBPalpha target, inhibits metastatic tumor antigen 1 and regulates its functions. **Cancer Research**, v. 69, p. 5639–5642, 2009.

REED, W.; BOHLER, P.J.; SANDSTAD, B.; NESLAND, J.M. Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. **The Breast Journal**, v.10, p. 174, 2004.

REINTGEN, D.; GIULIANO, R.; COX, C.E. Sentinel node biopsy in breast cancer: an overview. **The Breast Journal**, v.6, p.299-305, 2000.

REIS-FILHO, J.S.; SIMPSON, P.T.; GALE, T.; LAKHANI, S.R. 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.; PROKOP, E.; MENZEL, C.; CIMPOCA, W.; RETTENBACHER, L. 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.

RESCIGNO, J.; ZAMPELL, J.C.; AXELROD, D. Patterns of axillary surgical care for breast cancer in the era of sentinel lymph node biopsy. **Annals of Surgery Oncology**, v. 16, p. 687-696, 2009.

RICHARD, F.; PACYNA-GENGELBACH, M.; SCHLÜNS, K.; FLEIGE, B.; WINZER, K.J.; SZYMAS, J.; DIETEL, M.; PETERSEN, I.; SCHWENDEL, A. Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 89, p. 305-310, 2000.

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

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

ROY, P.G.; PRATT, N.; PURDIE, C.A.; BAKER, L.; ASHFIELD, A.; QUINLAN, P.; THOMPSON, A.M. High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 355-360, 2010.

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

RUTGERS, E.J. Sentinel node biopsy: interpretation and management of patients with immunohistochemistry-positive sentinel nodes and those with micrometastases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 698-702, 2008.

SAHIN, A.A.; GURAY, M.; HUNT, K.K. Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, p. 869-78, 2009.

SAITO, S.; MORITA, K.; HIRANO, T. High frequency of common DNA copy number abnormalities detected by bacterial artificial chromosome array comparative genomic hybridization in 24 breast cancer cell lines. **Human Cell**, v. 22, p. 1-10, 2009.

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.

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

SANTOS, S.C.L.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.S.F.; URBAN, C.A.; LIMA, R.S.; BLEGGI-TORRES, L.F.; RONE, J.D.; HADDAD, B.R.; CAVALLI, L.R. Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastasis. **Citogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 16-21, 2008.

SCARFF, R.; TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors, **World Health Organization**, Geneva, v. 2, p.20, 1968.

SCELFO, R.A.; SCHWIENBACHER, C.; VERONESE, A.; GRAMANTIERI, L.; BOLONDI, L.; QUERZOLI, P.; NENCI, I.; CALIN, G.A.; ANGIONI, A.; BARBANTI-BRODANO, G.; NEGRINI, M. Loss of methylation at chromosome 11p15.5 is common in human adult tumors. **Oncogene**, v. 21, p. 2564-2572, 2002.

SCHERES, J.M.J.C. Identification of two robertsonian translocation with a giemsa banding technique. **Human Genetics**, v. 15. p. 253-256, 1972.

SCHMIDT-KITTLER, O.; RAGG, T.; DASKALAKIS, A.; GRANZOW, M.; AHR, A.; BLANKENSTEIN, T.J.; KAUFMANN, M.; DIEBOLD, J.; ARNHOLDT, H.; MULLER, P.; BISCHOFF, J.; HARICH, D.; SCHLIMOK, G.; RIETHMULLER, G.; EILS, R.; KLEIN, C.A. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, p. 7733-42, 2003.

SESHADRI, R.; FIRGAIRA, F.A.; HORSFALL, D.J.; MCCAUL, K.; SETLUR, V.; KITCHEN, P. 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.

SHEHATA, M.; BIÈCHE, I.; BOUTROS, R.; WEIDENHOFER, J.; FANAYAN, S.; SPALDING, L.; ZEPS, N.; BYTH, K.; BRIGHT, R.K.; LIDEREAU, R.; BYRNE, J.A. Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 5050-5060, 2008.

SHI, M.; LIU, D.; DUAN, H.; SHEN, B.; GUO, N. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 785-799, 2010.

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

SIMPSON, P.T.; REIS-FILHO, J.S.; LAMBROS, M.B.; JONES, C.; STEELE, D.; MACKAY, A.; IRAVANI, M.; FENWICK, K.; DEXTER, T.; JONES, A.; REID, L.; DA SILVA, L.; SHIN, S.J.; HARDISSON, D.; ASHWORTH, A.; SCHMITT, F.C.; PALACIOS, J.; LAKHANI, S.R. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. **Journal of Pathology**, v. 215, p. 231-244, 2008.

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.

SIWOSKI, A.; ISHKANIAN, A.; GARNIS, C.; ZHANG, L.; ROSIN, M.; LAM, W.L. An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. **Modern Pathology**, v. 15, p. 889-892, 2002.

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.; KUSTER, D.M.; BRUGGINK, E.D.; STROBBE, L.J. 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.

SØRLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LØNNING, P.; BØRRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.98, p. 10869-74, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LØNNING, P.E.; BROWN, P.O.; BØRRESEN-DALE, A.L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, p.8418-8423, 2003.

STANGE, D.E.; RADLWIMMER, B.; SCHUBERT, F.; TRAUB, F.; PICH, A.; TOEDT, G.; MENDRZYK, F.; LEHMANN, U.; EILS, R.; KREIPE, H.; LICHTER, P. 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. 15, p. 345-352, 2006.

STOECKLEIN, N.H.; KLEIN, C.A. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 589-598, 2010.

STOKOE, D. Pten. **Current Biology**, v.13, p.10-11, 2001.

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.

SUN, M.; WANG, G.; PACIGA, J.E.; FELDMAN, R.I.; YUAN, Z.Q.; MA, X.L.; SHELLEY, S.A.; JOVE, R.; TSICHLIS, P.N.; NICOSIA, S.V.; CHENG, J.Q. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. **American Journal of Pathology**, v. 159(2), p.431-7, 2001.

SUSNIK, B.; FRKOVIC-GRAZIO, S.; BRACKO, M. Occult micrometastases in axillary lymph nodes predict subsequent distant metastases in stage I breast cancer: a case-control study with 15-year follow-up. **Annals of Surgical Oncology**, v. 11, p. 553-554, 2004.

TAKEI, H.; SUEMASU, K.; KUROSUMO, M.; HORII, Y.; YOSHIDA, T.; NIMOMIYA, J.; YOSHIDA, M.; HAGIWARA, Y.; KAMIMURA, M.; HAYASHI, Y.; INOUE, K.; TABEL, I. 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.

TEIXEIRA, M.R.; PANDIS, N.; GERDES, A.M.; DIETRICH, C.U.; BARDI, G.; ANDERSEN, J.A.; GRAVERSEN, H.P.; MITELMAN, F.; HEIM, S. 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.; PANDIS, N.; HEIM, S. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.33, p.1-16, 2002.

THOMASSEN, M.; TAN, Q.; KRUSE, T.A. Gene expression meta-analysis identifies chromosomal regions and candidate genes involved in breast cancer metastasis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 113, p. 239-249, 2009.

TIMAR, J.; CSUKA, O; OROSZ, Z.; JENEY, A.; KOPPER, L. Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis. **Pathology Oncology Research**, v. 8, p. 204-219, 2002.

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

TORRES, L.; RIBEIRO, F.R.; PANDIS, N.; ANDERSEN, J.A.; HEIM, S.; TEIXEIRA, M.R. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 102, p. 143-155, 2007.

TROESTER, M.A.; HOADLEY, K.A.; SØRLIE, T.; HERBERT, B.S.; BORRESENDALE, A.L.; LONNING, P.E.; SHAY, J.W.; KAUFMANN, W.K.; PEROU, C.M. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 64(12), p. 4218-26, 2004.

TSUDA, H.; TAKARABE, T.; FUKUTOMI, T.; HIROHASHI, S. der(16)t(1;16)/der(1;16) in breast cancer detected by fluorescence in situ hybridization is an indicator of better patient prognosis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 24, p. 72-77, 1999.

TUBBS, R.R.; PETTAY, J.D.; ROCHE, P.C.; STOLER, M.H.; JENKINS, R.B.; GROGAN, T.M. 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.

TURNER, R.R.; OLLILA, D.W.; GIULIANO, A.E. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 23, p. 263-267, 1999.

TURNER, N.C.; REIS-FILHO, J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, p. 5846-53, 2006.

VALLADARES, A.; SALAMANCA, F.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; ARENAS, D. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 152, p. 162-166, 2004.

VAN BEERS, E.H.; NEDERLOF, P.M. Array-CGH and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 8, p. 210, 2006.

VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M.J.; et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, p. 530-536, 2002.

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

VERONESI, U.; GALIMBERTI, V.; ZURRIDA, S.; PIGATTO, F.; VERONESI, P.; ROBERTSON, C.; PAGANELLI, G.; SCIASCIA, V.; VIALE, G. 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.; VIALE, G.; LUINI, A.; ZURRIDA, S.; GALIMBERTI, V.; INTRA, M.; VERONESI, P.; ROBERTSON, C.; MAISONNEUVE, P.; RENNE, G.; DE CICCIO, C.; DE LUCIA, F.; GENNARI, R. 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.; VIALE, G.; GALIMBERTI, V.; LUINI, A.; ZURRIDA, S.; ROBERTSON, C.; SACCHINI, V.; VERONESI, P.; ORVIETO, E.; DE CICCIO, C.; INTRA, M.; TOSI, G.; SCARPA, D. 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.

VIALE, G.; ZURRIDA, S.; MAIORANO, E.; MAZZAROL, G.; PRUNERI, G.; PAGANELLI, G.; MAISONNEUVE, P.; VERONESI, U. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution, **Cancer**, v. 103, p. 492–500, 2005.

VIALE, G.; DELL'ORTO, P.; BIASI, M.O.; STUFANO, V.; DE BRITO LIMA, L.N.; PAGANELLI, G.; MAISONNEUVE, P.; VARGO, J.M.; GREEN, G.; CAO, W.; SWIJTER, A.; MAZZAROL, G. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. **Annals of Surgery**, v. 247, p. 136-142, 2008.

VIRTANEN, C.; WOODGETT, J. Clinical uses of microarrays in cancer research. **Methods in Molecular Medicine**, v.141, p.87-113, 2008.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C.L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Review Cancer**, v. 2, p. 489–501, 2002.

WANG, C.; IAKOVLEV, V.V.; WONG, V.; LEUNG, S.; WARREN, K.; IAKOVLEVA, G.; ARNESON, N.C.; PINTILIE, M.; MILLER, N.; YOUNGSON, B.; MCCREADY, D.R.; DONE, S.J. Genomic alterations in primary breast cancers compared with their sentinel and more distal lymph node metastases: an aCGH study. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 48, p. 1091-1101, 2009.

WANG, F.; WANG, L.; BRIGGS, C.; SICINSKA, E.; GASTON, S.M.; MAMON, H.; KULKE, M.H.; ZAMPONI, R.; LODA, M.; MAHER, E.; OGINO, S.; FUCHS, C.S.; LI, J.; HADER, C.; MAKRIGIORGOS, G.M. DNA degradation test predicts success in whole-genome amplification from diverse clinical samples. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, p. 441-451, 2007.

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.

WANG, Z.C.; LIN, M.; WEI, L.J.; LI, C.; MIRON, A.; LODEIRO, G.; HARRIS, L.; RAMASWAMY, S.; TANENBAUM, D.M.; MEYERSON, M.; IGLEHART, J.D.; RICHARDSON, A. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles

in subclasses of invasive breast cancers. **Cancer Research**, Chicago, v. 64(1), p. 64-71, 2004.

WEAVER, D.L.; KRAG, D.N.; ASHIKAGA, T.; HARLOW, S.P.; O'CONNELL, M. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. **Cancer**, v. 88, p. 1099-1107, 2000.

WEBER-MANGAL, S.; SINN, H.P.; POPP, S.; KLAES, R.; EMIG, R.; BENTZ, M.; MANSMANN, U.; BASTERT, G.; BARTRAM, C.R.; JAUCH, A. Breast cancer in young women (< or = 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. **International Journal of Cancer**, v. 107, p. 583-592, 2003.

WEIGELT, B.; VERDUIJN, P.; BOSMA, A.J.; RUTGERS, E.J.; PETERSE, H.L.; VAN'T VEER, L.J. 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.

WEISS, M.M.; HERMSEN, G.A.; MEIJER, G.A.; VAN GRIEKEN, N.C.; BAAK, J.P.; KUIPERS, E.J.; VAN DIEST, P.J. Comparative genomic hybridization. **Molecular Pathology**, v. 52, p. 243-251, 1999.

WERNICKE, A.G.; GOODMAN, R.L.; TURNER, B.C.; KOMARNICKY, L.T.; CURRAN, W.J.; CHRISTOS, P.J.; KHAN, I.; VANDRIS, K.; PARASHAR, B.; NORI, D.; CHAO, K.S.C. A 10-year follow-up of treatment outcomes in patients with early stage breast cancer and clinically negative axillary nodes treated with tangential breast irradiation following sentinel lymph node dissection or axillary clearance. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, p. 893-902, 2011.

WIDT-LEVERT, L.M.; TJAN-HEINEN, V.C.G.; BULT, P.; RUERS, T.; WOBES, T. 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.

WIECHEC, E.; OVERGAARD, J.; HANSEN, L.L. A fragile site within the HPC1 region at 1q25.3 affecting RGS16, RGSL1, and RGSL2 in human breast carcinomas. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 47, p. 766-780, 2008.

WIECHEC, E.; WIUF, C.; OVERGAARD, J.; HANSEN, L.L. High-resolution melting analysis for mutation screening of rgs11, rgs16, and rgs8 in breast cancer. **Cancer Epidemiological Biomarkers Preview**, v. 20, p. 397-407, 2011.

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

YAO, J.; WEREMOWICZ, S.; FENG, B.; GENTLEMAN, R.C.; MARKS, J.R.; GELMAN, R.; BRENNAN, C.; POLAK, K. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. **Cancer Research**, v. 66, p. 4065-4078, 2006.

YLSTRA, B.; VAN DEN IJSSEL, P.; CARVALHO, M.; BRAKENHOFF, R.H.; MEIJER, G.A. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 445-450, 2006.

YU, K.; LEE, C.H.; TAN, P.H.; TAN, P. Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.10, p. 5508–5517, 2004.

YU, W.; KANAAN, Y.; BAE, Y.K.; GABRIELSON, E. Chromosomal changes in aggressive breast cancers with basal-like features. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v. 193, p. 29-37, 2009.

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.

ZHU, L.; LOO, W.T.; CHENG, C.W.; CHOW, L.W. Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients. **Oncology Reports**, v.15, p. 1217-1223, 2006.

ZHOU, H.; KUANG, J.; ZHONG, L.; et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nature Genetics**, v. 20, p. 189-193, 1998.

ZHOU, C.; QIU, L.; SUN, Y.; HEALEY, S.; WANEBO, H.; KOUTTAB, N.; DI, W.; YAN, B.; WAN, Y. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes tsa's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. **International journal of oncology**, v. 1, p. 269-78, 2006.

ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA EXECUÇÃO DE ANÁLISE GENÉTICA VOLTADA PARA PESQUISA

As análises genéticas são exames realizados no DNA humano, nos cromossomos, nas proteínas ou qualquer outro produto gênico, com o objetivo de encontrar alterações no patrimônio genético que possam predispor ao aparecimento de doenças ou desencadear diferentes manifestações destas mesmas doenças. Todos os resultados obtidos destas análises, assim como em qualquer outro ato médico, são considerados estritamente confidenciais e vinculados ao segredo profissional.

Eu, abaixo assinado _____

Local de Nascimento: _____ Data do Nascimento: _____

Endereço: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Tel: _____

DECLARO ter sido informado do conteúdo e da finalidade deste projeto de pesquisa, o qual me foi proposta a adesão e de ter compreendido que qualquer que seja a minha decisão, ela não influirá no meu tratamento, nem ao acesso eventual a qualquer tecnologia nova que possa derivar desta pesquisa. Portanto:

() concordo () NÃO concordo que o material biológico pertencente à minha pessoa, guardado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, seja utilizado para pesquisa genética no câncer de mama.

() concordo () NÃO concordo que este material biológico possa ser enviado para estudo em outras instituições no exterior, com a finalidade de pesquisa genética no câncer de mama.

() concordo () NÃO concordo

que se entre em contato com membros da minha família para busca de informações ou mesmo de material biológico relevantes para a pesquisa (restrições ou comentários:

_____)

Além disso, declaro que:

() quero () NÃO quero

ser informado dos eventuais resultados ou de novas possibilidades diagnósticas que possam derivar desta pesquisa.

Me comprometo de comunicar qualquer eventual mudança de opinião da minha parte e do que foi declarado aqui.

Data: _____ Assinatura: _____

Assinatura do Responsável pela Pesquisa: _____

Código n° _____

HISTÓRIA PESSOAL

1- Registro hospitalar: _____

2- Sexo: () M () F; Peso atual (kg): _____ ; Altura: _____

3- A qual grande grupo étnico você pertence ?

Negróide () Caucasóide () Asiático () Indígena () Outros ()

4- Idade: _____

5- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não

Se não: Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste ()
Sudeste ()

6- Qual o seu grau de instrução?

() analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
() 2º grau completo () técnico () profissional () superior

Histórico de moradia

7- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?

() alvenaria () madeira () barro () mista

8- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje

() folha de zinco () brasilit-eternit () sapé () outro (qual?) _____

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

9- Qual a atividade profissional que exerceu ou exerce? Há quanto tempo?

10- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: _____

Derivados de petróleo () sim () não

(querosene, gasolina, solventes,...)

Tintas/ corantes () sim () não

Indústrias têxteis ou tecelagem () sim () não

Praguicidas / Herbicidas () sim () não

Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Processamento de madeira	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Papel ou celulose	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Mineração	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Fábrica de sapatos ou curtume	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Metalúrgica	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usina de açúcar ou álcool	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Plástico ou borracha	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Outras substâncias químicas:	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

11- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? (máscaras, luvas, óculos,...)

a) sim b) não

Histórico Tabagista

12- Você fuma atualmente? sim não

13- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?

a) 0-5 anos b) 5-10 anos c) >10

14- Quanto você fuma/fumava por dia ?

menos de ½ maço

de meio a 1 maço

mais de 1 maço (quantos:_____)

15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?

a) sim

b) não

Histórico de Etilismo

16- Você consome/consumiu bebidas alcólicas com frequência? sim não

17- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

a) 0-5 anos.

b) 5 –10 anos.

c) mais 10 anos.

18- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?

a) Destiladas

b) Não-Destilada

c) Outra

19- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?

no máximo um copo de 2 a 5 copos de 6 a 10 de 11 a 30 mais de 30

34- Usou ou usa pílulas anticoncepcionais?

() sim Por quanto tempo: _____ () não

35- Faz (ou fez) reposição hormonal? _____

Marcadores Tumorais

ERBB2: _____

TP53: _____

REP: _____

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histo-patológico):

Anexo 2**ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os critérios clínicos e metodológicos deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HNSG . Cumpriu todos os termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, da última revisão da Declaração de Helsinque e da Declaração Universal dos Direitos Humanos (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1978; MINISTÉRIO DA SAÚDE; CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1997; TRI-COUNCIL POLICY STATEMENT, 1998; WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2000). Registro CONEP:7220. Parecer n. 251/2003.

Anexo 3: Alterações cromossômicas observadas nos tumores primários, Santos et al., 2008.

	11*	12*	13*	14*	15*	16*	17*	18*	19*	20*
C 1	+1pter~p32	+1pter~p32	+1pter~p33 -1p31~p21 +1q33~pter	+1q22~qter -1pter~p21	+1pter~p32	+1pter~p32 +1q		+1pter~p31	+1pter~p33 +1q	+1pter~p33
C 2	-2q22~q36		-2q22~q34		-2q22~q36					
C 3			-3			+3q12~q24		-3pter~p21		
C 4	-4q		-4q						-4	
C 5			-5			+5q23~qter			-5p15.2~q23	
C 6	-6q13~q23		-6q13~q23	-6q13~q23	-6q13~q23	+6pter~21.2 -6q13~q23	-6q13~q23		-6q	
C 7			-7p21~p14 -7q22~q32						+7q32~qter	
C 8			-8			+8q	++8q24.1~qter			
C 9	++9q21~qter								-9p ++9q33~qter	
C 10										
C 11			-11q14~q22	-11q21~qter		+11p15~q21		+11p12~q14		
C 12			-12q14~q22 +12q24.1~qter			+12p22~p11.2			-12q14~q22	+12q23~qter
C 13	-13q13~q32	-13q13~q32	-13q	-13q13~q32		-13q			-13q13~32	
C 14										
C 15										
C 16	+16	+16p	+16	+16	+16		+16		+16p	+16
C 17	+17		+17		+17				+17q	+17p
C 18			-18q12~21			++18p -18q21~qter		+18	+18p	
C 19	+19	+19	+19	+19	++19	+19	+19		+19	+19
C 20	++20q	+20	+20	+20	++20	+20	+20q13.3	+20	+20 ++20q	+20
C 21		+21			++21q	+21	+21q		+21q	
C 22	+22q		+22	+22	+22	+22	+22q	+22	++22q	
C X		-Xq	-Xpter~p21 -Xq21~qter			+Xq13~q22			-X	

C1-CX: Cromossomo 1- cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda

Continua

Continuação

	21*	22*	23*	24*	25*	26*	27*	28*	29*	30*
C 1	+1pter~p32 -1p34.2~p21		++1pter~p33		+1p21~q24	+1q22~qter	+1pter~p32 +1q22~qter		+1pter~p33 -1p31~p21	
C 2	-2q22~q36		-2q22~q34			+2q24~qter		-2q22~q36		
C 3					+3					
C 4	-4								-4q	
C 5			-5q12~q22							
C 6	-6q13~q23		-6q13~q23 +6pter~p21.3				+6pter~p21.1	-6q13~q23	-6q13~q23	
C 7										+7q22~qter
C 8			+8p -8q11.2~q21.3			+8q23~qter -8pter~p21				
C 9			+9q31~qter			+9q31~qter			-9pter~p21 +9p13~q21	
C 10										
C 11			-11q14~q22 +11pter~p15			++11p15~q21		+11p15~p21	+11p14~p12 -11q14~q22	
C 12			++12q23~qter -12q14~q22		+12q23~qter	+12q23~qter			-12q14~q22 +12q23~qter	
C 13	-13q13~q32		-13q13~32			-13q13~q32		-13q13~q32	-13q13~32	
C 14			+14q24~qter							
C 15						-15q23~qter			+15q22~q25	+15q22~qter
C 16	+16		+16 ++16q22~qter	+16p	+16	-16q13~qter	+16p	+16	+16q22~qter	
C 17	+17	+17	+17 ++17q				+17p		+17	
C 18	+18p			+18p				+18p		
C 19	++19		+19	+19p			+19	+19	++19	+19
C 20	++20	+20q13	++20q	+20p		++20q12~qter	+20		+20	+20p
C 21	+21q		+21q				++21q			
C 22	+22		++22				+22			
C X	-Xq21~q26		-Xq21~q26 ++Xq26				-Xpter~21 -Xq21~q26		-Xp22.2~p11.3 -Xq21~q26	

C1-CX: Cromossomo 1- cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda

Alterações cromossômicas observadas nas metástases nos linfonodos sentinela, Santos et al., 2008.

Casos	11*	12*	13*	14*	15*	16*	17*	18*	19*	20*
C 1	+1pter~p32	+1pter~p32	+1pter~p33 -1p31~p21 +1q32~qter	-1pter~p21 +1q22~qter	+1pter~p32			+1pter~p33		
C 2	-2q22~q36		-2q22~q34	-2			-2p21~p12 -2q14.1~q31		-2q32~q36	
C 3										
C 4	-4q				-4q					+4q33~qter
C 5			-5q						-5q14~q23	
C 6	+6pter~p21.1 -6q13~23			+6pter~p21.1 -6q13~q23	-6q13~q23	-6p -6q13~q23		+6p21.3~p21.1	-6q13~q23	
C 7										
C 8				+8q23~qter			+8p12~p22			
C 9	++9q21~qter		+9q31~qter	++9q21~qter						
C 10								+10p		
C 11				+11p15~q21						
C 12			+12q23~qter							
C 13	-13q13~q32	-13q13~q32			-13q13~q32		++13q22~q31	-13q13~q32		
C 14						-14q22~qter				
C 15							-15q14~q22			+15q24~qter
C 16	+16	+16p	+16	+16	+16p	-16q				
C 17	+17		+17		+17		+17p	+17q22~qter		
C 18				-18q		-18q21~qter		+18p -18q	-18q12~q22	
C 19	+19	+19	++19		++19	+19		+19 ++19p	+19	
C 20	+20		+20 ++20q12~q13.1	+20	+20					
C 21				+21q				+21q	+21q	
C 22	+22q	+22q			+22		+22q	+22	+22q	
C X			-Xq21~qter		-Xq21~q26	+Xq13~q22		-Xpter~p21 -Xq	-Xp22.1~p11.4 -Xq21~q26	

C1 – CX: Cromossomo 1 – cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda.

Continua

Continuação

Casos	21*	22*	23*	24*	25*	26*	27*	28*	29*	30*
C 1	+1p32~p31	+1q22~qter	-1p31~p21 +1q	-1p32~p22 +1q21~q31	+1pter~p32 +1p21~q24	+1pter~p32 +1q22~qter	+1pter~p32			+1pter~p32 -1p31~p21
C 2			-2q22~q34			+2q24~qter		-2q22~q36		
C 3			-3p13~q13.3							
C 4			-4		-4		-4			-4
C 5			+5		-5p15.2~q23		-5			-5q12~q32
C 6		-6q13~q23	-6q		+6pter~p21.1 -6q13~q23		-6q13~q23	-6q13~q23		+6p
C 7			-7p15~q31							
C 8			+8p21~p11.2 +8q23~qter			++8q23~qter				
C 9			+9q31~qter		+9q31~qter					
C 10									-10q21~q22	
C 11			+11pter~p15 -11q14~q22		+11p15~q21	+11q		+11p15~q21		
C 12			+12q23~qter		+12q23~qter	+12q23~qter				-12q14~q22
C 13			-13q13~q32		-13q13~q32	-13q13~q32	-13q13~q32	-13q13~q32		-13q13~q32
C 14			+14q24~qter							
C 15			+15q22~q25			-15q23~qter				
C 16			+16	+16	+16	-16q12~qter		+16		+16
C 17			+17		+17		+17			+17
C 18				+18p				+18p	+18p	
C 19	+19p	+19	++19	+19			++19		+19	++19
C 20		+20	+20 ++20q	+20p	+20q12~qter		+20	+20		+20
C 21		++21q	+21q						+21	++21q
C 22		+22	++22	+22			+22		+22	+22
C X			-Xq21~q26	-Xp22.1~p11.4 -Xq21~q26				-X		-Xpter~p21 -Xq21~q26

C1 – CX: Cromossomo 1 – cromossomo X; +: ganho; ++: amplificação; -: perda.

Anexo 4: Regiões mais comumente alteradas e respectivos genes.

Região	Genes
8q24.3	<i>GPR20, PTP4A3, FLJ43860, NCRNA00051, TSNARE1, BAI1, ARC, JRK, PSCA, LY6K, C8orf55, SLURP1, LYPD2, LYNX1, LY6D, GML, CYP11B1, CYP11B2, LOC100133669, LY6E, C8orf31, LY6H, GPIHBP1, ZFP41, GLI4, ZNF696, TOP1MT, C8orf51, RHPN1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, C8orf73, NAPRT1, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, BREAA2, LOC100130274, MAPK15, FAM83H, SCRIB, MIR937, PUF60, NRBP2, EPPK1, PLEC1, MIR661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8orf30A, HEATR7A, SCXB, SCXA, BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIR939, MIR1234, SLC39A4, VPS28, NFKBIL2, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24, MGC70857, KIAA1688, ZNF251, ZNF34, RPL8, ZNF517, ZNF7, COMMMD5, ZNF250</i>
11p15.5- p15.4	<i>RIC8A, SIRT3, PSMD13, NLRP6, ATHL1, IFITM5, IFITM2, IFITM1, IFITM3, B4GALNT4, PKP3, SIGIRR, ANO9, PTDSS2, RNH1, HRAS, LRRC56, C11orf35, RASSF7, MIR210, LOC143666, PHRF1, IRF7, MUPCDH, SCT, DRD4, DEAF1, TMEM80, EPS8L2, TALDO1, PDDC1, CEND1, SLC25A22, LRDD, RPLP2, SNORA52, PNPLA2, EFCAB4A, CD151, POLR2L, TSPAN4, CHID1, AP2A2, MUC6, MUC2, MUC5B, TOLLIP, LOC255512, BRSK2, HCCA2, DUSP8, LOC338651, KRTAP5-1, KRTAP5-2, KRTAP5-3, KRTAP5-4, KRTAP5-5, FAM99A, FAM99B, KRTAP5-6, LOC402778, CTSD, SYT8, TNNI2, LSP1, TNNT3, MRPL23, LOC100133545, H19, MIR675, IGF2, INS-IGF2, MIR483, IGF2AS, INS, TH, ASCL2, C11orf21, TSPAN32, CD81, TSSC4, TRPM5, KCNQ1, KCNQ10T1, KCNQ1DN, CDKN1C, SLC22A18AS, SLC22A18, PHLDA2, NAP1L4, SNORA54, CARS, OSBPL5, ZNF195, ART5, ART1, NUP98, CHRNA10, ADM</i>
11q13.1- q13.4	<i>MARK2, RCOR2, NAA40, COX8A, OTUB1, MACROD1, FLRT1, STIP1, FERMT3, TRPT1, NUDT22, DNAJC4, VEGFB, FKBP2, PPP1R14B, PLCB3, BAD, GPR137, KCNK4, C11orf20, ESRRA, TRMT112, PRDX5, CCDC88B, RPS6KA4, MIR1237, SLC22A11, SLC22A12, NRXN2, RASGRP2, PYGM, SF1, MAP4K2, MEN1, CDC42BPG, EHD1, MIR192, MIR194-2, ATG2A, PPP2R5B, GPHA2, C11orf85, BATF2, ARL2, SNX15, SAC3D1, NAALADL1, CDCA5, ZFPL1, C11orf2, TM7SF2, ZNHIT2, FAU, MRPL49, SYVN1, SPDYC, CAPN1, SLC22A20, POLA2, CDC42EP2, DPF2, TIGD3, SLC25A45, FRMD8, NEAT1, MIR612, MALAT1, SCYL1, LTBP3, SSSCA1, FAM89B, EHBP1L1, KCNK7, MAP3K11, PCNXL3, SIPA1, RELA, KAT5, RNASEH2C, DKFZp761E198, OVOL1, SNX32, CFL1, MUS81, EFEMP2, CTSW, FIBP, CCDC85B, FOSL1, C11orf68, DRAP1, TSGA10IP, SART1, EIF1AD, BANF1, CST6, CATSPER1, GAL3ST3, SF3B2, PACS1, KLC2, RAB1B, CNIH2, YIF1A, TMEM151A, CD248, RIN1, BRMS1, B3GNT1, SLC29A2, NPAS4, MRPL11, PELI3, DPP3, BBS1, ZDHHC24, ACTN3, CTSF, CCDC87, CCS, RBM14, RBM4, RBM4B, SPTBN2, C11orf80, RCE1, PC, LRFN4, C11orf86, SYT12, RHOD, KDM2A, ADRBK1, ANKRD13D, SSH3, LOC100130987, POLD4, CLCF1, RAD9A, PPP1CA, TBC1D10C, ATPGD1, RPS6KB2, PTPRCAP, CORO1B, GPR152, CABP4, TMEM134, AIP, PITPNM1, CDK2AP2, CABP2, GSTP1, NDUFV1, NUDT8, TBX10, ACY3, ALDH3B2, LOC645332, UNC93B1, ALDH3B1, NDUFS8, TCIRG1, CHKA, SUV420H1, C11orf24, LRP5, SAPS3, GAL, MTL5, CPT1A, MRPL21, IGHMBP2, MRGPRD, MRGPRF, TPCN2, MYEOV, CCND1, ORAOV1, FGF19, FGF4, FGF3, ANO1, FADD, PPFIA1, MIR548K, CTTN, SHANK2, DHCR7, NADSYN1, KRTAP5-7, KRTAP5-8, KRTAP5-9, KRTAP5-10, KRTAP5-11, FAM86C, DEFB108B, LOC100133315, RNF121, IL18BP, NUMA1, LRTOMT, C11orf59, C11orf51, FOLR3, FOLR1, FOLR2, INPPL1, PHOX2A, CLPB, PDE2A, MIR139, ARAP1, STARD10, ATG16L2, FCHSD2</i>

16p11.2	<i>TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, CCDC95, TBC1D10B, MYLPF, SEPT1, ZNF48</i>
17q12-q21	<i>ARHGAP23, SRCIN1, C17orf96, MLLT6, CISD3, PCGF2, PSMB3, PIP4K2B, CWC25, C17orf98, RPL23, SNORA21, LASP1, FBXO47, PLXDC1, ARL5C, CACNB1, RPL19, STAC2, LOC90110, FBXL20, MED1, CDK12, NEUROD2, PPP1R1B, STARD3, TCAP, PNMT, PGAP3, ERBB2, C17orf37, GRB7, IKZF3, ZPBP2, GSDMB, ORMDL3, GSDMA, PSMD3, CSF3, MED24, SNORD124, THRA, NR1D1, MSL1, CASC3, RAPGEFL1</i>
17q25.1-q25.3	<i>CD300A, CD300LB, CD300C, CD300LD, C17orf77, CD300E, RAB37, CD300LF, SLC9A3R1, NAT9, TMEM104, GRIN2C, FDXR, FADS6, USH1G, OTOP2, OTOP3, C17orf28, CDR2L, ICT1, ATP5H, KCTD2, SLC16A5, ARMC7, NT5C, HN1, SUMO2, NUP85, GGA3, MRPS7, MIF4GD, SLC25A19, GRB2, KIAA0195, CASKIN2, TSEN54, LLGL2, MYO15B, RECQL5, LOC643008, LOC100130933, SAP30BP, ITGB4, GALK1, H3F3B, UNK, UNC13D, WBP2, TRIM47, TRIM65, MRPL38, FBF1, ACOX1, C17orf106, CDK3, EVPL, SRP68, GALR2, ZACN, EXOC7, FOXJ1, RNF157, FAM100B, QRICH2, PRPSAP1, SPHK1, UBE2O, AANAT, RHBDF2, CYGB, PRCD, SNORD1C, SNORD1B, SNORD1A, ST6GALNAC2, ST6GALNAC1, MXRA7, JMJD6, C17orf95, SFRS2, MIR636, MFSD11, MGAT5B, C17orf86, SCARNA16, SEC14L1, SEPT9, FLJ45079, TNRC6C, TMC6, TMC8, C17orf99, SYNGR2, TK1, AFMID, BIRC5, EPR1, LOC283999, SOCS3, PGS1, DNAH17, CYTH1, USP36, TIMP2, LGALS3BP, CANT1, C1QTNF1, ENGASE, HRNBP3, ENPP7, CBX2, CBX8, CBX4, TBC1D16, CCDC40, GAA, EIF4A3, CARD14, SGSH, SLC26A11, RNF213, LOC100294362, FLJ35220, NPTX1, RPTOR, CHMP6, FLJ90757, BAIAP2, AATK, MIR657, MIR338, MIR1250, LOC388428, AZI1, C17orf56, C17orf89, SLC38A10, C17orf55, TMEM105, BAHCC1, ACTG1, FSCN2, C17orf70, NPLOC4, TSPAN10, PDE6G, C17orf90, CCDC137, ARL16, HGS, MRPL12, SLC25A10, GCGR, FAM195B, DYSFIP1, P4HB, ARHGDI, THOC4, ANAPC11, NPB, PCYT2, SIRT7, MAFG, LOC92659, PYCR1, MYADML2, NOTUM, ASPSCR1, STRA13, LRRC45, RAC3, DCXR, RFNG, GPS1, DUS1L, FASN, CCDC57, SLC16A3, CSNK1D, CD7, SECTM1, TEX19, UTS2R, C17orf101, HEXDC, C17orf62, NARF, FOXK2, WDR45L, RAB40B, FN3KRP, FN3K, TBCD, ZNF750, B3GNTL1</i>
20q13.33	<i>TAF4, LSM14B, PSMA7, SS18L1, GTPBP5, HRH3, OSBPL2, ADRM1, LAMA5, RPS21, CABLES2, C20orf151, GATA5, C20orf200, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLC04A1, LOC100127888, NTSR1, C20orf20, OGFR, COL9A3, TCFL5, DPH3B, DIDO1, C20orf11, SLC17A9, BHLHE23, NCRNA00029, HAR1B, HAR1A, MIR124-3, YTHDF1, BIRC7, NKAIN4, FLJ16779, ARFGAP1, COL20A1, CHRNA4, KCNQ2, EEF1A2, PDPF, PTK6, SRMS, C20orf195, PRIC285, GMEB2, STMN3, RTEL1, TNFRSF6B, ARFRP1, ZGPAT, LIME1, SLC2A4RG, ZBTB46, C20orf135, TPD52L2, DNAJC5, MIR941-1, MIR941-2, MIR941-3, UCKL1, MIR1914, MIR647, UCKL1AS, ZNF512B, SAMD10, PRPF6, NCRNA00176, SOX18, TCEA2, RGS19, OPRL1, C20orf201, NPBWR2, MYT1</i>
21q22.3	<i>ABCG1, TFF3, TFF2, TFF1, TMPRSS3, UBASH3A, RSPH1, SLC37A1, PDE9A, WDR4, NDUFV3, PKNOX1, CBS, U2AF1, CRYAA, SIK1, C21orf125, C21orf84, HSF2BP, RRP1B, PDXK, CSTB, RRP1, LOC284837, AGPAT3, TRAPPC10, PWP2, C21orf33, ICOSLG, DNMT3L, AIRE, PFKL, C21orf2, TRPM2, LRRC3, C21orf29, C21orf90, KRTAP10-1, KRTAP10-2, KRTAP10-3, KRTAP10-4, KRTAP10-5, KRTAP10-6, KRTAP10-7, KRTAP10-8, KRTAP10-9, KRTAP10-10, KRTAP10-11, KRTAP12-4, KRTAP12-3, KRTAP12-2, KRTAP12-1, KRTAP10-12, UBE2G2, SUMO3, PTTG1IP, ITGB2, C21orf67, C21orf70, NCRNA00162, C21orf122, ADARB1, POFUT2, LOC642852, COL18A1, NCRNA00175, SLC19A1, PKNOX1, CBS, BACE2, FAM3B, MX2, MX1, TMPRSS2, RIPK4, PRDM15, C2CD2, ZNF295, UMODL1, FLJ41733, SNF1LK</i>
Xq13.1	<i>PJA1</i>

