FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA

**Pesquisa de instabilidade gênica induzida por
quimioterapia antineoplásica nas células
mononucleares do sangue periférico de mulheres com
câncer de mama**

Tese apresentada ao Departamento de
Hematologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Hematologia
Orientador: Prof. Dr. Auro Del Giglio

São Paulo
2005

FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA

**Pesquisa de instabilidade gênica induzida por
quimioterapia antineoplásica nas células
mononucleares do sangue periférico de mulheres com
câncer de mama**

Tese apresentada ao Departamento de
Hematologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Hematologia
Orientador: Prof. Dr. Auro Del Giglio

São Paulo
2005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pacientes que voluntariamente contribuíram para a realização do mesmo e por terem me ensinado a viver com esperança, alegria e otimismo.

AGRADECIMENTOS

Tese terminada, todos os capítulos escritos e agora? A cada capítulo, uma dificuldade, um aprendizado e é claro muitas lembranças! Apesar das dificuldades uma certeza: de que sem a ajuda de algumas pessoas não teria conseguido. Percebo que uma tese não é escrita só com os capítulos já descritos, falta algo, falta agradecer a aqueles que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização desse trabalho.

A Deus, por ter me dado pais e irmãos que sempre me apoiaram em meus atos, por ter me dado uma família que comemora todos os meus sucessos e me apóia nos meus insucessos, por ter me dado amigos com quem posso contar em todos os momentos e por ter me dado a oportunidade nessa vida de estudar e trabalhar na área da saúde.

Ao Prof. Dr. Auro Del Giglio, orientador desse trabalho, pela paciência, pelos 8 anos de convívio marcados com entusiasmo e ensinamentos científicos, pelos ensinamentos para a realização desse trabalho, por ter me dado a oportunidade de ingressar em um grande projeto FAPESP, da qual esta tese faz parte, por incentivar a ciência na minha vida e principalmente por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone – pelo ingresso na pós-graduação e pela permissão de utilizar os Laboratórios da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo.

À Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro – pelo ingresso na pós-graduação e pela paciência com que trata os alunos da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Israel Bendit, pelos primeiros ensinamentos em biologia molecular, pela ajuda nos experimentos, por ter aberto as portas do seu Laboratório disponibilizando materiais e aparelhos para a realização de grande parte dessa tese, pelos telefonemas para discussão de técnicas e resultados da tese, pela paciência às perguntas infundadas e pela argüição no exame de qualificação dando-me mais ensinamentos e subsídios para o término da tese.

À Sra. Vivian, secretária do Laboratório de Biologia Tumoral, por toda a ajuda na compra de materiais, pela ajuda na montagem do Laboratório de Biologia Molecular da FMABC.

Às secretárias da pós-graduação, Terezinha, Carol e Nilda, pelo carinho e respeito com que me tratam e por todas as dicas nesses anos de pós.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Camargo Paschoal, Diretor da Faculdade de Medicina do ABC, pelo incentivo diário ao meu trabalho no laboratório da faculdade.

À Profa. Nidia Caivano, Secretária Executiva da FMABC, pelo apoio irrestrito no desenvolvimento dos trabalhos na faculdade.

Ao Dr. João Metanios Hallack, Diretor Executivo da Fundação do ABC, por todo apoio no início da minha carreira, pelos conselhos durante as caronas para que eu pudesse entender as dificuldades, pelos momentos de distração e principalmente, pela amizade e respeito adquiridos nesses últimos anos.

À Dra. Mafalda Megumi Yoshinaga Novaes, eterna professora e chefe, por ter acreditado em mim desde do início, por ter me dado a oportunidade de trabalho em um momento tão difícil da minha vida, por todos os ensinamentos em laboratório e pela amizade e carinho com que me trata sempre.

À Sra. Cristiane Moura Gáscon, por sempre dar a luz nos momentos de trevas, pela serenidade com que conduz os mais difíceis fatos e por ajudar no crescimento e projeção do laboratório da FMABC.

Ao Dr. Shiguero Harada, Coordenador dos Ambulatórios, por ter me liberado para a realização dos créditos da pós-graduação, por ter dado livre acesso às informações do SAME da FMABC.

Aos Médicos do Setor de Oncologia e Hematologia da FMABC, pela ajuda nos dados clínicos e pelo convívio diário.

Ao Dr. Jairo Cartun, pela amizade e convívio diário na FMABC.

Às Dras. Jandey Bigonha e Patrícia W. Bolman, pela amizade e companheirismo na FMABC.

Ao Dr. Reinaldo Manhani, pelos ensinamentos iniciais em biologia molecular, pela disponibilidade nos primeiros projetos desenvolvidos no Laboratório de Biologia Tumoral e pela amizade.

À Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Burgos Manhani, pela amizade e dicas na condução da pós graduação, por me aliviar com conselhos otimistas nos momentos mais difíceis durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro, pelo empréstimo dos materiais necessários e por ter disponibilizado aparelhos do seu laboratório.

À Profa. Dra. Vânia D'Almeida, pela arguição no exame de qualificação e pelos ensinamentos para o término da tese.

À Profa. Dra. Éster Cerdeira Sabino, pela arguição no exame de qualificação e pelos ensinamentos para o término da tese.

À Dra. Claudia Muraro, pela paciência e competência na avaliação de cada resultado dessa tese, amostra por amostra, gel a gel.

À Profa Dra. Maria Aparecida Pinhal, pela ajuda na interpretação dos resultados do seqüenciamento.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Tumoral e Citogenética da FPS-SP, Dra. Elvira, Dra. Mônica, Cristina, Tânia, Patrícia, Cora, Valéria, Carol, Ericson e Daniela pelo carinho com que me receberam no laboratório e pelo convívio durante esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Sorologia da FPS-SP, Dra. Cláudia Barreto, Dra. Ana, Walter, Sabri e Suzete, pela ajuda no seqüenciamento genético e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica da FPS-SP, Víctor, Roberto, Carlos e Marli pelo convívio nos últimos anos.

Aos amigos do setor administrativo da FMABC, Roseli, Valéria, Rosemeire, Karen, Gi, Zenilda, Jú, Malú, Edna, Vivian, Natália, Dani, Dani, Néia, Sílvia, Dilene e Amanda pela amizade e convívio diário.

Às Sras. Clotilde, Adelaide, Valdinéia e Inezita, chefes das voluntárias da oncologia na FMABC pela amizade e respeito e ajuda financeira para a realização desse trabalho através da AVCC.

À Profa. Dra. Vírginia B. C. Junqueira, minha primeira orientadora, exemplo de pesquisadora e ser humano, pela amizade e ensinamentos no início da minha carreira.

À Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes, também orientadora, por ter me iniciado no laboratório e ter me dado o primeiro contato com a pesquisa básica.

Aos amigos Dr. Leandro e Dra. Karin, pela amizade e pelos momentos de descontração durante esses anos.

Aos amigos Raphael, Fábio, Isabel, Simone, Michael, Luis, Fabiana, Yara, Célia, Paulão, Fefa por entenderem a minha ausência nos últimos encontros.

Ao amigo Marco Aurélio, pela ajuda nas fotos dos resultados dessa tese.

À Profa. Inara Benez, por ter diminuído os problemas com a língua inglesa e pela paciência com que me ensina em todas as aulas.

À Profa. Dra. Enny Fernandes Silva, pela amizade e pelos ensinamentos de bioquímica e biologia molecular na graduação.

À Dra. Regina, Dra. Ethel, Dra. Roseli, Dra. Fabíola, Dra. Melly e Marlise pelas parcerias e pelas amizades adquiridas nesses anos de trabalho na FMABC.

À Profa. Dra. Ligia Ajaime Azzalis, pela correção da língua portuguesa e por toda a ajuda no término desse trabalho, exemplo de ser humano e amiga para todos os momentos, sua infinita bondade me ensina a cada encontro e engrandece o meu respeito e carinho pela sua pessoa.

À Dra. Luciana Caputto, pela amizade e ajuda na confecção dos slides para a aula de qualificação, com muitas setas, muitos itens e sub-itens.

À Sra. Rita Ortega, bibliotecária, pela disponibilidade e ajuda na formatação desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas da FMABC, Alê, Ana Paula, Cláudia, Fernanda, Jorge, Thais, Leuda e Camila pela amizade, pelo companheirismo, pela ajuda irrestrita nas técnicas e realização dos gráficos, pelo incentivo e por tornarem o trabalho diário mais agradável. Sem a amizade e ajuda deles eu não teria conseguido.

A minha família, Dedé, Dinha, Tios Álvaro e Sheila, Vó Elisa, Vó Renata, Hilda, Tia Valéria, Tia Cleide, Aline, Renata, Sérgio e primos Cláudia, Renato, Daniela e Márcio que sempre preenchem com alegria os encontros em minha casa e por entenderem a minha ausência em alguns encontros e por me incentivarem sempre.

Ao meu irmão gêmeo Alexandre, pela amizade e confiança, por sempre me ajudar nas decisões da minha vida e por estar comigo em todos os momentos fáceis ou difíceis.

Ao meu irmão Ricardo e sua esposa Vivianne, pela amizade e respeito e por vibrarem com as minhas conquistas.

Aos meus queridos pais Geraldo e Maria Júlia, que sempre me incentivaram, que me ensinaram o principal na vida: o respeito ao ser humano e a doação do bem, por nunca me deixarem só ou desamparado nas piores decisões e por terem me dado condições de estudo desde do início até os dias de hoje.

" Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim " (Chico Xavier)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer de mama	1
1.2	Prevenção do câncer de mama	2
1.3	Deteção precoce do câncer de mama	3
1.4	Diagnóstico do câncer de mama	4
1.4.1	Exame Clínico	4
1.4.2	Diagnóstico das lesões palpáveis.....	5
1.4.3	Diagnóstico histopatológico	6
1.4.4	Características da neoplasia	7
1.4.5	Estado linfonodal	8
1.4.6	Avaliação das margens cirúrgicas de ressecção	8
1.4.7	Marcadores prognósticos avaliados por imuno-histoquímica	8
1.4.8	Estadiamento.....	10
1.5	Tratamento	14

1.5.1	Cirurgia	14
1.5.2	Radioterapia	14
1.5.3	Quimioterapia e hormonioterapia	15
1.5.4	Estádios I, II e III (operável)	15
1.5.5	Estádio III (não operável)	18
1.5.6	Estádio IV (terapia paliativa)	19
1.5.7	Efeitos secundários ao tratamento quimioterápico	21
1.6	Conceitos Básicos em Genética	22
1.6.1	Microsatélites	25
1.6.2	Instabilidade de Microsatélites (MSI)	26
1.6.3	Alterações no DNA	27
1.6.4	Erro na replicação	27
1.6.5	Alteração mutagênica de um nucleotídeo	29
1.6.6	Deslizamento da replicação	30
1.6.7	Reparo do DNA	32
1.6.8	Reparo por excisão	33
1.6.9	Reparo do mau pareamento	35
1.6.10	Reparo do filamento duplo por recombinação homóloga	36
1.6.11	Implicações Clínicas da Avaliação da Instabilidade de Microsatélites (MSI).....	38
1.6.12	Definição Clínica de MSI e aplicação em HNPCC	41
1.6.13	Aplicação de MSI em câncer de mama	44
1.6.14	Aplicação de MSI em outros tumores	45

1.6.15	Aplicação de MSI em Leucemias	46
2	OBJETIVOS	49
3	PACIENTES E MÉTODOS	50
3.1	Pacientes	50
3.2	Coleta de Sangue Periférico	52
3.3	Separação da Fração Mononuclear do Sangue Periférico	53
3.4	Extração de DNA da fração mononuclear	54
3.5	Deteção da Instabilidade de Microssatélites (MSI)	56
3.5.1	Regiões de microssatélites estudadas	56
3.5.2	Amplificação das regiões de microssatélites estudadas	59
3.6	Verificação de MSI e LOH nas amostras amplificadas	60
3.7	Análise Estatística	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Características clínicas das pacientes	63
4.2	Características laboratoriais das pacientes	66
4.2.1	Verificação da amplificação das regiões de microssatélites	66
4.2.2	Verificação de MSI e LOH em gel de poliacrilamida	69
4.2.3	Resultados das análises dos géis de poliacrilamida	73
4.3	Avaliação estatística dos resultados	77
4.4	Características laboratoriais do grupo controle externo	79
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	93

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8	ANEXOS.....	110
	Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
	Anexo 2 – Tabela 1: Resultados gerais das análises laboratoriais das pacientes.....	112
	Anexo 3 – Questionário para doadoras de sangue (Controle Externo).....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Associação de adriamicina e ciclofosfamida
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa Institucional
CMF	Associação de ciclofosfamida, metrotexato e fluoracil
DNA	Ácido desoxirribunucleico
ECM	Exame Clínico da Mama
Erb-B2	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FAC	Associação de fluoracil, adriamicina e ciclofosfamida
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (hibridização <i>in situ</i>)
G-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos
G2/M/S	Fases do ciclo celular
H-MSI	Elevada frequência de instabilidade de microsatélites
HNPCC	Câncer colo-retal hereditário sem polipose
Htx	Hormonioterapia
Kb	Kilobases
Ki-67	Anticorpo monoclonal anti – Ki-67
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
L-MSI	Baixa frequência de instabilidade de microsatélites
LOH	Perda de Heterozigosidade
M	Metástases
MA	Miliampères
MGMT	O ⁶ metilguanina-DNA metil transferase
mL	Mililitros
MMR	Sistema de Reparo de DNA
MSI	Instabilidade de Microsatélites
MSS	Estável ou ausência de instabilidade
N	Comprometimento nodal

NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PAG	Punção através de agulha grossa (<i>core biopsy</i>)
PB	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RER	Erro de replicação
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minutos
Rxt	Radioterapia
SMD	Síndrome Mielodisplásica
T	Tamanho do tumor
TMX	Tamoxifeno
TNM	Estadiamento do tumor por meio da classificação tumor, nódulo e metástase
UICC	União Internacional contra o Câncer
μL	Microlitros
USG	Ultra-sonografia
V	Volts
W	Watts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais das regiões de microssatélites estudadas ..	58
Tabela 2 – Características das pacientes	64
Tabela 3 - Tipo de tratamento sistêmico com MSI	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tamanho do Tumor (T)	11
Quadro 2 - Linfonodos Regionais (N)	12
Quadro 3 - Metástases (M)	13
Quadro 4 - Estadiamento TNM do câncer de mama por agrupamento	13
Quadro 5 - Tratamento de pacientes nos estadios I, II e III (doença operável) conforme o risco de recorrência	16
Quadro 6 - Tratamento de pacientes nos estadios I, II e III (doença operável) com risco elevado de recorrência	17
Quadro 7 - Recomendações de Hormonioterapia em pacientes no estadio IV	19
Quadro 8 - Recomendações para Quimioterapia em pacientes no estadio IV	20
Quadro 9 - Esquema de Fearon e Vongelstein de mutação genética que ocorre na progressão de adenoma para carcinoma	39
Quadro 10 - Critérios de Amsterdã	43
Quadro 11 - Critérios de Bethesda	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das pacientes em relação ao tratamento sistêmico	65
Gráfico 2 - Distribuição das pacientes em relação à positividade das regiões de microssatélites estudadas	75
Gráfico 3 - Distribuição das pacientes em relação à quantidade de regiões consideradas instáveis	76
Gráfico 4 - Estágio de tratamento sistêmico e amostras com instabilidade de microssatélites	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de erro na replicação causando uma mutação	28
Figura 2 - Alteração mutagênica de um nucleotídeo ocasionada por um mau pareamento e resultando em uma mutação	29
Figura 3 - Deslizamento da replicação	31
Figura 4 - Esquema do reparo por excisão	34
Figura 5 - Esquema do reparo do mau pareamento	36
Figura 6 - Reparo do filamento duplo por recombinação homóloga	37
Figura 7 - Ilustração da amplificação e conseguinte verificação em gel de agarose 2% para a região <i>TP53ALU</i>	67
Figura 8 - Ilustração da amplificação e conseguinte verificação em gel de agarose 2% para a região <i>TP53PCR15.1</i>	68
Figura 9 - Gel de Poliacrilamida – Verificação de MSI na região <i>TP53ALU</i>	70
Figura 10 - Gel de Poliacrilamida – Verificação de LOH na região <i>TP53PCR15.1</i>	70
Figura 11 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região <i>BAT-40</i>	71
Figura 12 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região <i>BAT-26</i>	71
Figura 13 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região <i>MFD-41</i>	72
Figura 14 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região <i>MFD-28</i>	72
Figura 15 - Gel de poliacrilamida para a região <i>PCR15.1</i>	80
Figura 16 - Gel de poliacrilamida para a região <i>TP53ALU</i>	80

FONSECA, FLA. *Pesquisa de instabilidade gênica induzida por quimioterapia antineoplásica nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres com câncer de mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

RESUMO

O tratamento sistêmico é extremamente importante na abordagem clínica do câncer de mama. O presente estudo teve a finalidade de avaliar se a quimioterapia sistêmica é capaz de produzir instabilidade genética representada por instabilidade de microssatélites (MSI) e perda de heterozigosidade (LOH) na fração mononuclear do sangue periférico de pacientes portadoras de câncer de mama. Foram estudadas 119 amostras de sangue, obtidas seqüencialmente antes, durante e após a quimioterapia. Das 30 pacientes avaliadas, 27 apresentaram MSI em pelo menos uma das amostras estudadas e 6 desenvolveram LOH. Uma importante correlação foi obtida entre o número de eventos de MSI por amostra e quimioterápicos com agentes alquilantes ($p < 0,0001$). Entretanto, quando as amostras foram de pacientes em radioterapia, observou-se um menor número de eventos de MSI por amostra ($p=0,038$). Concluímos que o tratamento sistêmico pode induzir MSI e LOH em células mononucleares do sangue periférico de pacientes em tratamento quimioterápico com agentes alquilantes.

FONSECA, FLA. *Systemic chemotherapy induces microsatellite instability in the peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

SUMMARY

Systemic chemotherapy is an important part of treatment for breast cancer. We conducted the present study to evaluate whether systemic chemotherapy could produce microsatellite instability (MSI) in the peripheral blood mononuclear cell fraction of breast cancer patients. We studied 119 sequential blood samples from 30 previously untreated breast cancer patients before, during and after chemotherapy. In 27 out of 30 patients we observed MSI in at least one sample, and six patients had loss of heterozygosity (LOH). We found a significant correlation between the number of MSI events per sample and chemotherapy with alkylating agents ($p < 0.0001$). However, when the samples were obtained in patients with radiotherapy we observed low MSI events per samples ($p = 0.038$). We concluded that systemic chemotherapy may induce MSI and LOH in peripheral blood mononuclear cells from breast cancer patients receiving alkylating agents.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é provavelmente o mais temido tipo de câncer pelas mulheres devido a sua alta frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção de sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente¹.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima 1.050.000 novos casos de câncer de mama por ano em todo o mundo, o que torna esse tipo de câncer o mais comum entre as mulheres². No Brasil, de acordo com as informações processadas pelos Registros de Câncer de Base Populacional, disponíveis para 16 cidades brasileiras, o câncer de mama foi o mais freqüente no país durante a década de 90, sendo que as maiores taxas de incidência foram observadas em São Paulo, Distrito Federal e Porto Alegre³.

Além disso, o câncer de mama constitui-se na primeira causa de morte por câncer, entre as mulheres, registrando-se uma variação percentual relativa de mais de 80% em pouco mais de duas décadas⁴. Em 2000, foram registradas 8.390 mortes decorrentes deste tipo de câncer. Dos 402.190 novos casos de câncer previstos de serem diagnosticados em 2003, o câncer de mama foi o segundo mais incidente entre a população feminina, sendo responsável por 41.610 novos casos e 9.335 óbitos¹.

Internacionalmente, observa-se em alguns países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Dinamarca, Holanda e Noruega, um aumento na incidência do câncer de mama acompanhado de uma redução da mortalidade associada a esse câncer. Isso se deve a detecção precoce por introdução da mamografia para rastreamento e a oferta ao tratamento adequado². Em outros países, como o Brasil, o aumento na incidência tem sido acompanhado pelo aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um retardamento no diagnóstico e na instituição de terapêutica adequada⁵.

No ambulatório de Oncologia e Quimioterapia da Faculdade de Medicina do ABC, essa doença é responsável por cerca de 40% de todas as neoplasias e, infelizmente é diagnosticada predominantemente em estádios avançados⁶, o que constitui um importante obstáculo para a sua abordagem.

1.2 Prevenção do câncer de mama

Embora, alguns fatores ambientais e comportamentais estejam associados a um risco aumentado de desenvolver o câncer de mama, estudos epidemiológicos não fornecem evidências conclusivas que justifiquem a recomendação de estratégias específicas de prevenção através de intervenções ambientais^{1,5}. Recomenda-se, entretanto, que alguns fatores de

risco, especialmente a obesidade e o tabagismo sejam alvo de ações preventivas.

1.3 Detecção precoce do câncer de mama

Para a detecção precoce do câncer de mama, recomenda-se, com base em diretrizes emitidas pelo Ministério da Saúde do Brasil⁵:

- a) Rastreamento anual, por meio do exame clínico da mama, em todas as mulheres a partir de 40 anos de idade. Este procedimento é ainda compreendido como parte do atendimento integral à saúde da mulher, devendo ser realizado em consultas clínicas, independente da faixa etária;
- b) Rastreamento por mamografia, para as mulheres com idade entre 50 a 69 anos, com o máximo de dois anos entre os exames;
- c) Exame clínico da mama e mamografia anual, a partir dos 35 anos, para as mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer de mama;

São definidos como grupos populacionais com risco elevado para o desenvolvimento do câncer de mama⁵:

- a) Mulheres com história familiar de pelo menos um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com diagnóstico de câncer de mama, abaixo dos 50 anos de idade;
- b) Mulheres com história familiar de pelo menos um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com diagnóstico de câncer de mama bilateral ou câncer de ovário, em qualquer faixa etária;
- c) Mulheres com história familiar de câncer de mama masculino;
- d) Mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ*.

1.4 Diagnóstico do câncer de mama

A seguir será apresentado um esboço das diferentes formas de diagnóstico de câncer de mama, bem como os procedimentos utilizados na prática clínica e a utilização de exames complementares que auxiliam a suspeita em um exame clínico minucioso.

1.4.1 Exame clínico

O exame clínico da mama (ECM) é parte fundamental da propedêutica para o diagnóstico de câncer. Faz parte do exame físico e ginecológico e ainda é a base para a solicitação de exames complementares. Deve contemplar os

seguintes passos para a sua realização: inspeção estática e dinâmica, palpação das axilas e palpação da mama com a paciente em decúbito dorsal^{7,8}.

1.4.2 Diagnóstico das lesões palpáveis

O método de escolha para avaliação por imagem das lesões palpáveis em mulheres com menos de 35 anos de idade é a ultra-sonografia (USG). Em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, elege-se a mamografia como método de avaliação⁸. Ainda, a mamografia pode ser complementada pela USG em três diferentes situações: em nódulo sem expressão devido à densidade da mama ou por estar na zona cega na mamografia; quando o nódulo apresenta-se regular ou levemente lobulado assemelhando-se a um cisto e, quando a densidade do nódulo apresenta-se assimétrica difusa podendo ser uma lesão sólida, cisto ou parênquima mamário^{9,10}.

As lesões classificadas nas categorias 2 e 5¹¹ com risco estimado de albergarem carcinoma e, para confirmação do diagnóstico, pode-se proceder o exame citológico a partir de punção aspirativa com agulha fina (PAAF), ou ainda o exame histológico, que é utilizado quando o material for obtido por punção através de agulha grossa (PAG) e também a biópsia cirúrgica convencional^{12,13}.

A PAAF é um procedimento ambulatorial de baixo custo, fácil execução, dispensa a utilização de anestesia e dificilmente apresenta complicações permitindo o diagnóstico das lesões palpáveis. Já o PAG (*core biopsy*) também é um procedimento ambulatorial, mas necessita de anestesia e fornece

condições para o diagnóstico histopatológico (por congelação) das lesões permitindo, inclusive, a determinação de receptores hormonais^{12,13}.

No caso de lesões palpáveis, mesmo aquelas que apresentarem imagem negativa tanto na mamografia quanto na ultra-sonografia, a investigação diagnóstica deve ser prosseguida utilizando PAAF, PAG ou biópsia cirúrgica¹⁴. O diagnóstico prévio reduz o estresse da mulher quanto ao conhecimento do procedimento cirúrgico pela qual será submetida, otimiza o planejamento das atividades do centro cirúrgico, além de ser de custo inferior quando comparado a uma internação para biópsia cirúrgica convencional¹⁵.

1.4.3 Diagnóstico histopatológico

Mais de 90% dos pacientes com câncer de mama têm o subtipo histológico de carcinoma ductal infiltrativo. Alguns tipos histológicos, entretanto, estão associados à evolução clínica favorável, como por exemplo, o tubular, mucinoso, cístico adenóide e carcinoma cribiforme invasivo. Alguns autores incluem também os carcinomas tubulolobular e papilar neste grupo^{16,17}.

O relatório histopatológico necessita conter todos os elementos necessários para a abordagem clínica do paciente sob o ponto de vista prognóstico e terapêutico. Deve ainda conter a descrição das características da neoplasia, do estado linfonodal, do comprometimento das margens cirúrgicas de ressecção e o resultado dos marcadores prognósticos, atualmente avaliados por imunohistoquímica¹⁸.

1.4.4 Características da neoplasia

Consideram-se as seguintes características do tumor :

- 1) Tamanho do Tumor: para fins de estadiamento dos tumores por meio da classificação TNM (Tumor, Nódulo e Metástase). Considera-se o maior diâmetro do componente invasivo do tumor. A medida macroscópica deve ser confirmada pela medida microscópica. Em casos que ocorrem discrepância, predominará a medida avaliada na microscopia. Em casos de tumores multifocais ou multicêntricos, a medida considerada é a do maior tumor. Sempre se deve relatar a porcentagem de ductos que contêm o componente *in situ* ^{18,19}.
- 2) Tipo histológico: a classificação do tipo histológico deve seguir a terminologia da OMS, atualizada em 2003¹⁸.
- 3) Grau Histológico: recomenda-se a utilização do grau histológico combinado de Nottingham (Scarff, Bloon, Richardson modificado por Elston-Ellis, 1998), que inclui: percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico²⁰.
- 4) Invasão Vascular peritumoral nos vasos sangüíneos ou linfáticos: tanto os vasos sangüíneos quanto os linfáticos podem ser invadidos por células tumorais¹⁸. A presença de êmbolos tumorais em vasos linfáticos peritumorais está associada ao aumento de recorrência e a invasão de vasos sangüíneos correlaciona-se ao desenvolvimento de metástase à distância e pior prognóstico¹⁸.

1.4.5 Estado linfonodal

O relatório deve contemplar ainda os seguintes itens quando se trata de comprometimento dos linfonodos²¹:

- número de linfonodos dissecados (mínimo de 10)
- número de linfonodos comprometidos
- tamanho do maior foco metastático
- invasão capsular e extensão a tecidos extranodais
- coalescência

1.4.6 Avaliação das margens cirúrgicas de ressecção

As margens cirúrgicas de ressecção devem estar descritas, considerando-se “margem comprometida” a presença de neoplasia na área pintada com tinta nanquim. No caso de “margens livres”, designa-se em milímetros, a distância da neoplasia à menor margem⁸.

1.4.7 Marcadores prognósticos avaliados por imuno-histoquímica

Atualmente, os principais fatores preditivos avaliados do prognóstico de mulheres com câncer de mama é a determinação de receptores hormonais. A presença dos receptores está relacionada com o benefício da terapia hormonal e esse procedimento é recomendado em todos os casos, citando-se o percentual de positividade¹⁸. Desse modo, será considerado positivo o tumor

que apresentar receptores em pelo menos 10% das células¹⁸. O estado de receptor de estrogênio e progesterona tem valor prognóstico. Dessa maneira, tumores que não tem algum ou ambos desses receptores são propensos à recidiva²².

Ainda em relação a recidiva precoce, existem também as avaliações da taxa de crescimento tumoral. Essas avaliações indiretas da fase S da célula utilizam antígenos associados ao ciclo celular, como PCNA e Ki-67. Diversos estudos sugerem que os tumores com alta proporção de células na fase S apresentam risco maior de recidiva e a quimioterapia oferece maior benefício em termos de sobrevida no caso desses tumores²².

Outros dois fatores prognósticos relacionados às alterações moleculares no tumor também são úteis e estão sendo utilizados por imuno-histoquímica. Os tumores que hiperexpressam receptor Erb-B2 do fator de crescimento epidérmico ou têm um gene *P53* que sofreu mutação possui um prognóstico pior. É fato que tumores que hiperexpressam o fator epidérmico são mais prováveis de responder a esquemas terapêuticos contendo altas doses de doxorrubicina e também podem ser sensíveis ao anticorpo monoclonal Herceptin. Portanto, a determinação de Erb-B2 é uma medida de valor para decidir a terapia a ser instituída²².

1.4.8 Estadiamento

O estadiamento do câncer de mama baseia-se na classificação dos tumores malignos (TNM), proposta pela União Internacional contra o Câncer (UICC). Essa classificação segue as características do tumor primário, dos linfonodos da cadeia de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e ainda, a presença ou ausência de metástase à distância. A classificação TNM aplica-se apenas aos carcinomas, sendo indispensável a confirmação histológica e, quando houver múltiplos tumores, o maior deles será considerado para definições dos parâmetros. Se houver tumores sincrônicos bilaterais, a classificação de cada um deles será feita de maneira separada¹⁹.

A seguir será apresentada uma síntese da classificação conforme o tamanho do tumor (T), comprometimento nodal (N) e metástases (M), agrupadas por estadios, as diversas combinações possíveis, seguindo a União Internacional Contra o Câncer (UICC)¹⁹.

Quadro 1 - Tamanho do Tumor (T).

Tx	Tumor não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com até 2,0 cm
T1mic	Carcinoma Microinvasor (até 1 mm)
T1a	Tumor com até 1,0 cm em sua maior dimensão.
T1b	Tumor com mais de 0,5 até 1,0 cm em sua maior dimensão.
T1c	Tumor com mais de 1,0 cm e até 2,0 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor com 2,0 cm até 5,0 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5,0 cm em sua maior dimensão
T4	Qualquer T com extensão para pele ou parede torácica
T4a	Extensão para parede torácica
T4b	Edema (incluindo <i>peau d'orange</i>), ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites na mesma mama
T4c	Associação T4a + T4b
T4d	Carcinoma inflamatório

FONTE: TNM Classification of malignant tumors – IUCC¹⁹.

Complementando o quadro acima, faz-se necessário colocar duas observações:

- 1) O comprometimento do músculo grande peitoral não caracteriza T4.
- 2) Presença de retração da pele ou papila não interfere no estadiamento.

Quadro 2 - Linfonodos Regionais (N).

Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase
N1	Linfonodo(s) homolateral(s) móvel(s) comprometido(s)
N2	Metástase para linfonodos axilares homolaterais, fixos uns aos outros ou fixos às estruturas vizinhas ou metástase clinicamente aparente* somente para linfonodos da cadeia mamária interna homolateral.
N2a	Metástase para linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou fixos às estruturas vizinhas.
N2b	Metástase clinicamente aparente somente para linfonodos da cadeia mamária interna homolateral, sem evidência clínica de metástase axilar.
N3	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência clínica de metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es) ou da mamária interna.
N3a	Metástase para linfonodos infraclavicular(es) homolateral(is)
N3b	Metástase para linfonodos da mamária interna homolateral e para linfonodos axilares
N3c	Metástase para linfonodos supraclaviculares homolaterais

FONTE: TNM Classification of malignant tumors – IUCC¹⁹.

* clinicamente aparente é definido como detectado por estudos de imagem (exceto linfocintigrafia), pelo exame clínico ou pelo diagnóstico patológico macroscópico¹⁹.

Quadro 3 - Metástases (M).

Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância (Incluindo LFN supraclaviculares)

FONTE: TNM Classification of malignant tumors – IUCC¹⁹.

Quadro 4 - Estadiamento TNM do câncer de mama por agrupamento.

Estadio	Agrupamento
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I	T1 N0 M0
Estadio II A	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0
Estadio II B	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Estadio III A	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
Estadio III B	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Estadio III C	T qq N3 M0*
Estadio IV	Tqq Nqq M1*

FONTE: TNM Classification of malignant tumors – IUCC¹⁹.

* qq = qualquer

1.5 Tratamento

Atualmente, pode-se distinguir dois tipos de modalidade terapêutica. O primeiro classificado como tratamento loco-regional que compreende a modalidade cirúrgica e a radioterapia e o segundo, classificado como tratamento sistêmico pela qual engloba a quimioterapia e a hormonioterapia⁵.

1.5.1 Cirurgia

A indicação dos diferentes tipos de cirurgia no tratamento do câncer de mama, irá depender principalmente do estadiamento clínico e do tipo histológico. Essa cirurgia pode ser conservadora quando se trata de ressecção de um segmento da mama (setorectomia, tumorectomia alargada e quadrantectomia) com retirada dos gânglios axilares ou linfonodos sentinelas, como também a cirurgia pode ser não conservadora recebendo o nome de mastectomia⁵.

1.5.2 Radioterapia

É utilizada com o objetivo de destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia. Após cirurgias conservadoras, deve ser aplicada em toda a mama da paciente, independente

do tipo histológico, idade, uso de quimioterapia ou hormonioterapia ou mesmo com as margens cirúrgicas livres de comprometimento neoplásico⁵.

1.5.3 Quimioterapia e hormonioterapia

A terapia sistêmica segue-se ao tratamento cirúrgico instituído. Sua recomendação deve basear-se no risco de recorrência^{22,23,24}. As mulheres com indicação de mastectomia como tratamento primário, podem ser submetidas à quimioterapia neoadjuvante, seguida de tratamento cirúrgico conservador, complementado por radioterapia²². Para aquelas que apresentarem receptores hormonais positivos, recomenda-se a hormonioterapia⁵.

1.5.4 Estádios I, II e III (operável)

As pacientes consideradas com risco mínimo de recorrência devem ser submetidas a seguimento periódico. Para aquelas pacientes com risco baixo deve-se usar Tamoxifeno (TMX), por cinco anos^{22,23,24}. Já as com risco elevado, o tratamento a ser instituído dependerá da avaliação dos seguintes fatores: responsividade aos hormônios, presença de menopausa e comprometimento nodal⁵, como mostrado nos quadros 5 e 6.

Quadro 5 - Tratamento de pacientes nos estadios I, II e III (doença operável) conforme o risco de recorrência.

Risco de Recorrência	Características	Recomendações
Mínimo	Idade superior a 35 anos e Tumor menor que 1,0 cm e linfonodo axilar negativo ou Tumor tubular ou mucinoso ou medular típico ou papílifero menor do que 3,0 cm e linfonodo negativo	Seguimento Periódico
Baixo	Idade superior a 35 anos e Tumor entre 1,0 e 2,0 cm e Grau I ou grau II e Receptor hormonal (estrogênio e/ou progesterona) positivo e linfonodo negativo	TMX, por cinco anos
Elevado	Idade inferior a 35 anos ou Tumor maior que 2,0 cm ou Grau III ou receptor hormonal (estrogênio e progesterona) negativo e linfonodo negativo	Ver quadro 7

FONTE: Consenso sobre Controle do Câncer de Mama – MS/INCA⁵.

Quadro 6 - Tratamento de pacientes nos estadios I, II e III (doença operável) com risco elevado de recorrência.

Condições	Pré-Menopausa	Pós-Menopausa
Hormônio Responsivo Com linfonodo axilar negativo	Antracíclico (até 6 ciclos) ou CMF (associação de ciclofosfamida, metotrexato e fluoracil) seguidos de TMX por 5 anos	TMX por 5 anos ou Antracíclico (até 6 ciclos) seguido de TMX por 5 anos
Com linfonodo axilar positivo	Antracíclico (até 6 ciclos) seguidos de TMX por 5 anos	TMX por 5 anos ou Antracíclico (até 6 ciclos) seguido de TMX por 5 anos
Hormônio não Responsivo Com linfonodo axilar negativo	Antracíclico até 6 ciclos	Antracíclico até 6 ciclos
Com linfonodo axilar positivo	Antracíclico até 6 ciclos	Antracíclico até 6 ciclos

FONTE: Consenso sobre Controle do Câncer de Mama – MS/INCA⁵.

Até o momento, não existe indicação formal de substituição de TMX por inibidor de aromatase⁵. Quando pré existe contra indicação para o uso de TMX, como na presença de doença tromboembólica, doença cérebro-vascular ou

ainda carcinoma de endométrio e nos tumores iniciais, que se desenvolvem durante o uso de TMX, sugere-se o uso de inibidor de aromatase como terapia adjuvante somente em mulheres na pós-menopausa e com tumores positivos para receptores hormonais^{5,23}. Em mulheres com idade superior a 70 anos, poucos estudos avaliam o impacto da quimioterapia adjuvante⁵, portanto o uso dessa terapia nessa faixa etária de idade deve ser feita de forma criteriosa e individualizada.

1.5.5 Estadio III (não operável)

No tratamento neoadjuvante está recomendado o uso de Antracíclico (até 6 ciclos) ou ainda CMF (ciclofosfamida)^{5,22,23}. Quando houver impossibilidade de administração de quimioterapia, deve-se instituir a hormonioterapia e ainda, recomenda-se TMX por 4 a 6 meses⁵. Quando ocorre falha no uso de Antracíclico, deve-se indicar a radioterapia acrescida de hormonioterapia, se o tumor for receptor positivo⁵.

O tratamento adjuvante consiste no uso de TMX, por 5 anos, em pacientes com tumores positivos para receptores hormonais^{5,22}.

Não existe um consenso sobre o uso neoadjuvante dos Taxanes e seus benefícios para as mulheres com câncer de mama⁵, sendo necessário maiores estudos a seu respeito.

1.5.6 Estadio IV (terapia paliativa)

A doença metastática é considerada incurável, portanto, seu tratamento é considerado paliativo. Deve-se sempre que possível confirmar cito ou histologicamente a doença metastática e isoladamente indica-se a hormonioterapia dentro do uso da sua possibilidade. O quadro 7 indica o uso de hormonioterapia, somente em tumores com receptores hormonais positivos⁵.

Quadro 7 - Recomendações de Hormonioterapia em pacientes no estadio IV.

Hormonioterapia	Pré-Menopausa	Pós-Menopausa
1ª Linha	Ablação Ovariana ^a ou TMX	TMX
2ª Linha	TMX isolado ^b ou ablação ovariana isolada	Inibidor de Aromatase ^c
3ª Linha	Inibidor de Aromatase ^c	Acetato de Megestrol ^d
4ª Linha	Acetato de Megestrol ^d	-

FONTE: Consenso sobre Controle do Câncer de Mama – MS/INCA⁵.

- a A ablação ovariana pode ser realizada por cirurgia ou radioterapia.
- b A terapêutica hormonal de segunda linha, na pré-menopausa, fica na dependência da opção adotada como 1ª linha.
- c A utilização de inibidores de aromatase deve ser feita somente em mulheres na pós-menopausa ou, se na pré-menopausa, apenas naquelas em que foi realizada ablação ovariana.
- d Não há evidências de aumento de sobrevida com a utilização de inibidores de aromatase na primeira-linha do tratamento paliativo de mulheres na pós-menopausa, com câncer de mama receptor hormonal positivo.

A quimioterapia é recomendada nos tumores negativos para receptores hormonais, nos casos de doença visceral sintomática ou extensa e quando há

progressão após intervalo curto da manipulação hormonal prévia (4 meses), devendo ser recomendada conforme indicação do quadro 8.

Quadro 8 - Recomendações para Quimioterapia em pacientes no estadio IV.

Quimioterapia	Drogas Recomendadas
1ª Linha	CMF ou FAC (associação de fluoracil, adriamicina e ciclofosfamida)
2ª Linha	Taxanes ou Capecitabina ou Vinorelbine
3ª Linha	Taxanes ou Capecitabina ou Vinorelbine, desde que não tenha sido usada como 2ª linha.

FONTE: Consenso sobre Controle do Câncer de Mama – MS/INCA⁵.

NOTAS: 1) A escolha de quimioterapia paliativa de primeira linha está na dependência de tratamento adjuvante prévio e do intervalo entre a sua administração e a recorrência da doença. Em caso de intervalo superior a um ano, pode-se considerar reinstituição do mesmo esquema quimioterápico. Entretanto, a reutilização de esquema terapêutico com Adriamicina estará vinculado à dose prévia utilizada, respeitando-se o limite total de 450 mg/m².

2) Considerar a quimioterapia de terceira linha, desde que anteriormente tenham sido empregados CMF e Adriamicina.

3) O uso da quimioterapia paliativa deve ser adotada por no máximo 6 meses em cada linha.

Recentemente, há evidências de aumento de sobrevida com a utilização Trastuzumab associado à quimioterapia, em pacientes com tumores que superexpressam HER-2. Essa superexpressão pode ser verificada através de imuno-histoquímica conforme citado no item 1.4.7²². Entretanto, a sua utilização na rede pública brasileira está condicionada a estudos de avaliação econômica realizados pelo Ministério da Saúde⁵.

1.5.7 Efeitos secundários ao tratamento quimioterápico

O tratamento sistêmico representado pela quimioterapia é uma parte importante da abordagem terapêutica de pacientes com câncer de mama. Dependendo do estadio do tumor, sugere-se uma quimioterapia adjuvante ou paliativa. Apesar da consistente melhora na sobrevida das pacientes que utilizam a quimioterapia sistêmica adjuvante, aproximadamente 1% dessas pacientes desenvolveram leucemias secundárias e/ou mielodisplasia, e isso pôde ser atribuído aos efeitos genotóxicos causados por este tipo de tratamento²⁵.

O efeito genotóxico desse tipo de tratamento sistêmico vem sendo amplamente reportado na literatura. Chaplain et al.²⁶ avaliaram o risco de desenvolvimento de Leucemia Aguda após o uso de quimioterapia adjuvante em pacientes com câncer de mama. Os autores verificaram que houve um aumento do risco, quando comparado com o restante da população feminina que não possuía tal diagnóstico e ainda, concluíram que este aumento ocorria tanto no tratamento com quimioterápicos quanto no uso de radioterapia²⁶.

Em outro estudo retrospectivo de verificação dessa relação, Linassier et al.²⁷ relacionam a combinação de mitoxantrona com ciclofosfamida, fluoracil e radioterapia com o aparecimento de leucemias mielóides agudas (LMA) e apesar de terem verificado uma baixa incidência, a presença de LMA e de síndrome mielodisplásica (SMD) secundárias conferiam um péssimo prognóstico no seguimento clínico dessas pacientes²⁷. Essa relação também foi

discutida quando Briasoulis et al.²⁸ reportaram o aparecimento de Leucemia Aguda Bifenotípica em uma paciente que havia sido tratada com quimioterapia adjuvante, radioterapia e profilaxia com fator de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF)²⁸.

A relação entre o tratamento adjuvante e o surgimento de Leucemias Agudas e Mielodisplasias nessas pacientes está amplamente documentada na literatura. Desta forma, este cenário no qual se administra quimioterapia adjuvante a pacientes com câncer de mama pode permitir melhor compreender o processo de leucemogênese induzido por quimioterapia adjuvante.

1.6 Conceitos Básicos em Genética

Antes de conceituar e entender o que são microsátélites e qual o seu emprego na medicina de uma forma geral, é importante rever alguns conceitos básicos em genética, bem como fazer um resumo histórico dessa parte das ciências biológicas.

A palavra genética deriva da raiz grega *gen*, que significa vir a ser. Foi empregada pela primeira vez em 1906, por Bateson, para designar o estudo da hereditariedade e da variação dos seres vivos²⁹. A Genética tem raízes milenares, sendo muito antigo o conhecimento da transmissão hereditária de

algumas condições patológicas. Hipócrates, entre 460 e 377 a.C., já fazia menção a doenças hereditárias ou familiares³⁰. Apesar destas raízes milenares, a Genética é, contudo, um produto típico do século XX, resultante da integração de áreas da ciência como Citologia, Estatística, Bioquímica e Biologia Molecular, permitindo novos horizontes na compreensão dos fenômenos da hereditariedade³³.

Gregor Mendel realizou seus experimentos em 1865, mas somente muito tempo depois os estudos nessa área foram retomados e a partir de 1880, o mundo começou a entender o processo de divisão das células somáticas e germinativas³⁰, e isso devido os trabalhos de Flemming, Strausburger, Waldeyer, van Beneden e Boveri²⁹. Assim, o conhecimento sobre o comportamento das células foi cada vez mais relacionado ao seu núcleo.

O mais importante aspecto do núcleo é o material genético. A região granular é identificada como cromatina e durante a divisão celular, a cromatina forma uma massa densa, chamada cromossomo³⁰. Os cromossomos podem ser vistos como um arranjo de ácidos nucleicos e proteínas. Estas proteínas (as histonas) são solúveis em água e se associam aos cromossomos humanos de maneira a formar os complexos (conhecidos como nucleossomos) que garantem a estabilidade estrutural dos cromossomos³⁰. Em humanos normais, o material genético é distribuído em 46 cromossomos, sendo 23 herdados do pai e 23 herdados da mãe. Portanto são diplóides, pois possuem duas cópias de cada informação genética³⁰. O ácido nucleico que constitui o cromossomo -

DNA - é organizado em segmentos lineares de bases nucleotídeas e seu tamanho é comumente referido em relação aos números de bases, ou kilobases (kb). Quando essa seqüência linear de bases representa o código da informação necessária para a produção de uma determinada proteína (e, portanto codifica a proteína) é denominado gene, sendo o conjunto de todos os ácidos nucléicos denominado genoma³⁰.

Estima-se que o genoma humano possui entre 100 e 150 mil genes, o que corresponde a aproximadamente 10% do genoma. Os demais 90% do genoma são compostos de seqüências repetidas de DNA que aparentemente não têm função codificante de proteínas, por esse motivo alguns autores relatam essa parte do genoma como “DNA lixo” ou “lixo genético”³⁴.

Outro aspecto importante na organização dos ácidos nucléicos que constituem um gene de organismos eucariontes é o fato de que parte considerável da informação contida num gene não é diretamente relacionada ao seu produto, a proteína. Igualmente, entre as já mencionadas regiões repetitivas, uma grande parte dos genes contém seqüências não codificantes, ou seja, o código não faz parte da proteína final. Tais regiões recebem o nome de íntrons, enquanto as regiões codificantes do gene recebem o nome de éxons. A função dos íntrons nos genes ainda não é completamente esclarecida, apesar das várias hipóteses postuladas. Além destas, um gene ainda apresenta uma região regulatória, responsável pelo controle da sua expressão (que deve ocorrer no momento e tipo de células apropriados)³⁰.

1.6.1 Microssatélites

Várias categorias diferentes de DNA repetitivo são reconhecidas. Uma característica distinta útil é se as seqüências repetidas (repetições) estão agrupadas em um ou alguns poucos locais ou se estão dispersas pelo genoma, intercaladas com seqüências de cópia única ao longo do cromossomo. As seqüências repetidas agrupadas constituem de 10 a 15% do genoma e consistem em arranjos de várias repetições curtas organizadas em tandem. Os diferentes tipos de tais repetições em tandem são coletivamente chamados de DNA satélite, assim denominados porque muitas das famílias de repetições originais em tandem podiam ser purificadas por densidade de centrifugação do resto do genoma como frações “satélite” do DNA³¹.

Assim as repetições tandem estão organizadas no sentido 3' de uma seqüência seguida da extremidade 5' de uma outra seqüência ficando portanto alinhadas na mesma direção. São situadas na região do centrômero e repetidas milhares de vezes³².

De acordo com a extensão da seqüência repetitiva, as repetições tandem podem ser classificadas em: satélites, minissatélites e microssatélites³⁵.

Satélites: são as repetições mais extensas.

Minissatélites: são compostos por repetições de 9 a 80 pares de bases nucleotídicas (pb).

Microsatélites: são pequenas repetições incluindo apenas um a seis nucleotídeos. Assim sendo, podem ser estes microsatélites compostos por um mononucleotídeo (AAAAAAAAAAAAA), dinucleotídeo (CACACACACACA), trinucleotídeo (CAGCAGCAGCAGCAGCAG) e assim por diante.

O número de repetições de minissatélites e microsatélites pode variar entre indivíduos, motivo pelo qual são considerados como as impressões digitais do DNA de cada um e são utilizadas em exames na Medicina Forense³⁵.

1.6.2 Instabilidade de Microsatélites (MSI)

A instabilidade de microsatélites será a observação de que o DNA extraído de células de determinados tumores apresentam alterações no número de unidades repetidas em um ou mais microsatélites quando comparados aos mesmos microsatélites existentes em amostras de DNA de um tecido normal do mesmo indivíduo, como aquele obtido nas células sangüíneas³⁶. Resumidamente, as células tumorais apresentam “impressões digitais” defeituosas em seu DNA quando comparadas aos outros tecidos do organismo³⁵.

1.6.3 Alterações no DNA

As alterações nos genes podem ocorrer espontaneamente ou ainda podem ser induzidas por agentes químicos ou radiação ultravioleta³⁷. Atualmente sabe-se que as mutações são alterações na estrutura do DNA e produzem consequências funcionais. As mutações causam doenças, inclusive estão presentes com extrema frequência em tumores, podendo, nestes casos, estar ligadas a agentes externos e assim representam um elo entre a herança e o ambiente. No entanto, sem as mutações não teria ocorrido evolução das formas de vida bem-organizadas³⁸.

1.6.4 Erro na replicação

A síntese de um novo filamento de DNA ocorre por replicação semiconservativa, fundamentada no pareamento complementar das bases^{37,38}. Os erros na replicação ocorrem em uma taxa de aproximadamente 1 em 10^5 células, essa taxa é reduzida cerca de 1 em 10^7 a 10^9 por mecanismos de revisão ou reparo. Quando ocorre um erro na replicação antes da próxima divisão celular (aqui referida como a primeira divisão após a mutação), por exemplo, uma citosina (C) pode ser incorporada em vez de uma adenina (A) no quinto par de bases, o mau pareamento resultante será reconhecido e eliminado por seu reparo na grande maioria dos casos³⁸.

Entretanto, se o erro não for detectado e permanecer, a próxima (segunda) divisão resultará em uma molécula mutante que contém um par CG, em vez de um AT, nessa posição. Com isso, essa mutação perpetuará nas células filhas e dependendo de sua localização dentro ou fora da região codificadora de um gene, consequências funcionais podem ocorrer devida à mudança de um códon³⁸. A seguir, a figura 1 ilustra essa condição.

Figura 1 - Ilustração de erro na replicação causando uma mutação.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

1.6.5 Alteração mutagênica de um nucleotídeo

Uma mutação pode ocorrer quando uma mudança estrutural de um nucleotídeo afeta sua capacidade de pareamento de bases assim o nucleotídeo alterado geralmente está presente em um filamento da molécula parental^{37,38}. Se isso acarretar a incorporação de uma base incorreta, tal como uma C em vez de uma T no quinto par de bases, o próximo (segundo) ciclo de replicação resultará em duas moléculas mutantes³⁵. A seguir, a figura 2 ilustra essa condição.

Figura 2 - Alteração mutagênica de um nucleotídeo ocasionada por um mau pareamento e resultando em uma mutação.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

1.6.6 Deslizamento da replicação

Uma classe diferente de mutações não envolve uma alteração de nucleotídeos individuais, mas resulta do alinhamento incorreto entre seqüências de DNA alélicas ou não-alélicas durante a replicação^{37,38}. Quando o filamento molde contém pequenas repetições em tandem, por exemplo, repetições do tipo CA como nos microssatélites, o filamento recém replicado e o filamento molde podem deslocar suas posições, um em relação ao outro. Sendo assim, o deslizamento da replicação ou da polimerase, pode acarretar em um deslizamento incorreto dessas repetições, algumas destas acabam sendo copiadas duas vezes ou absolutamente nenhuma vez, dependendo do sentido do deslocamento³⁸. Com relação ao filamento de replicação recente, pode-se distinguir o deslizamento anterógrado e o retrógrado³⁸. Se o filamento de DNA recém sintetizado se deslocar para frente permanecerá uma região de não pareamento no filamento parental, assim o deslizamento anterógrado resulta em uma inserção, ao passo que o deslizamento retrógrado do novo filamento resulta em deleção³⁸. Em seguida, a figura 3 ilustra a condição de deslizamento de replicação.

Figura 3 - Deslizamento da replicação.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

A instabilidade de microssatélites é um traço característico do câncer colo-retal hereditário sem polipose (HNPCC). Os genes HNPCC estão localizados nos cromossomos humanos 2p15-22 e 3p21.3³⁸. Aproximadamente 15% de todos os carcinomas colo-retais, gástricos e endométricos mostram instabilidade de microssatélites³⁷.

A instabilidade fica aqui representada pelo deslizamento da replicação e este fenômeno deve ser diferenciado do *crossing-over* desigual que ocorre durante a meiose, esse último resulta da recombinação entre seqüências adjacentes, mas não alélicas, em cromátides irmãs de cromossomos homólogos³⁸.

Entende-se que o DNA é uma molécula instável e sofre freqüentes alterações através de perdas de segmento e mutações ocorridas durante o processo de divisão celular. No entanto, como já citado, o sistema dispõe de algumas proteínas com a função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA³⁵. Estas proteínas são produzidas a partir de alguns genes conhecidos como genes de reparo (*mismatch repair genes* – MMR) e sua função é exercida de forma contínua, preservando assim os tecidos celulares^{35,37}. Dessa forma, a observação de um grande número de alterações nas seqüências de microssatélites em um determinado tecido tumoral demonstra a ausência de uma função normal de reparo de DNA, por conseguinte, uma evidência indireta de que existe uma deficiência na ação das proteínas de reparo causada pela presença de mutações³⁵.

1.6.7 Reparo do DNA

Como apresentado anteriormente, a vida não seria capaz sem o reparo do DNA danificado, uma vez que os erros de replicação, incluindo o mau pareamento e os fatores exógenos prejudiciais, constituem problemas cotidianos para um organismo vivo e baseado nesse contexto ocorreu uma evolução de um amplo repertório de genes de reparo tanto em seres procariontes quanto em eucariontes³⁸.

Os seguintes tipos de reparo de DNA podem ser diferenciados pelos seus mecanismos básicos³⁶:

- Reparo por excisão: para remover um sítio danificado do DNA, tal como um filamento com dímero de timina;
- Reparo do mau pareamento: para corrigir os erros de replicação de excisão de um trecho do DNA de filamento simples que contém a base incorreta;
- Reparo ligado à transcrição de genes ativos.

1.6.8 Reparo por excisão

O filamento de DNA danificado é distorcido e pode ser reconhecido por um conjunto de três proteínas, as endonucleases UvrA, UvrB e UvrC nos procariotos e XPA, XPB e XPC nas células humanas. Esse filamento de DNA é clivado em ambos os lados do dano por um complexo protéico de éxonucleases, sendo removido um trecho de aproximadamente 12 ou 13 nucleotídeos nos procariotos e de 27 a 29 nucleotídeos nos eucariotos^{38,39}. A síntese de reparo do DNA reconstitui o trecho removido, e uma DNA-ligase fecha a lacuna³⁹. A figura 4 ilustra o esquema do reparo por excisão.

Figura 4 - Esquema do reparo por excisão.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

1.6.9 Reparo do mau pareamento

Tal reparo corrige os erros de replicação, entretanto, o filamento de DNA recém sintetizado, que contém a base incorreta, deve ser distinguido do filamento parental, e o sítio do mau pareamento deve ser identificado³⁹. Essa distinção é feita com base em uma diferença de metilação nos procariotos, assim o filamento filho é sub-metilado nesse estágio^{38,39}.

A *E.coli* tem três sistemas de reparo do mau pareamento: reparo de segmento (*patch*) longo, reparo de segmento curto e reparo de segmento muito curto³⁵. O sistema de reparo de segmento longo pode repor 1 kb de DNA ou mais, para tanto necessita de três proteínas de reparo: MutH, MutL e MutS, cujas proteínas homólogas humanas são: hMSH1, hMLH1 e hMSH2³⁸. Mutações em seus respectivos genes causam câncer decorrente do reparo defeituoso do mau pareamento traduzindo a instabilidade de microssatélites^{35,38,39}. Em seguida, a figura 5 ilustra o esquema do reparo do mau pareamento, bem como a interação dos complexos protéicos que atuam no reparo do DNA.

Figura 5 - Esquema do reparo do mau pareamento.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

1.6.10 Reparo do filamento duplo por recombinação homóloga

O dano ao filamento duplo é uma consequência comum das radiações γ ³⁸. Uma via humana importante para o reparo indireto requer três proteínas, codificadas pelos genes ATM, BRCA1 e BRCA2³⁸. Suas denominações derivam-se das importantes doenças que resultam das mutações desses genes: ataxia telangectasia (ATM)⁴⁰ e predisposição ao câncer de mama (BRCA1 e BRCA2)⁴¹.

A proteína ATM faz parte da família das proteinoquinas e será ativada em resposta ao dano do DNA. Sua forma ativa fosforila a proteína BRCA1 em sítios específicos. Essa proteína fosforilada induz uma recombinação homóloga em cooperação com as proteínas BRCA2 e mRAD5, sendo esta última homóloga entre os mamíferos a proteína de reparo RECA de *E. coli*³⁸. Essa recombinação faz-se necessária para o reparo eficiente da dupla quebra do DNA³⁸. A proteína BRCA1 fosforilada também pode estar envolvida na transcrição e no reparo do DNA ligado à transcrição⁴¹. A figura 6 ilustra a interação de BRCA1 e BRCA2 no reparo do filamento duplo.

Figura 6 - Reparo do filamento duplo por recombinação homóloga.

FONTE: Passarge, 2004³⁸.

1.6.11 Implicações Clínicas da Avaliação da Instabilidade de Microssatélites (MSI)

Até o momento, foi apresentado que as alterações genéticas acarretam o desenvolvimento do câncer. Esse fenômeno tem sido extensivamente investigado por vários autores, principalmente no câncer colo-retal. Esse modelo é considerado ideal no processo carcinogênico, devido à abundância do tecido que mostra a progressão do momento pré-malignidade para malignidade, ou seja, de adenoma para carcinoma. A grande maioria dos tumores surgem de uma inativação mutacional dos genes supressores e da ativação de oncogenes⁴².

Fearon e Vogelstein demonstraram um modelo elegante de carcinogênese, onde após o evento de malignidade, pelo menos quatro a cinco genes estavam mutados e os mesmos eram responsáveis pelas propriedades biológicas do tumor⁴³.

O quadro a seguir, adaptado de Fearon e Volgestein, explica a seqüência das bases para o entendimento da evolução da malignidade, sendo o APC, K-ras, DCC e o p53 os mais comuns genes mutados no processo de evolução do câncer colo-retal⁴³.

Quadro 9 – Esquema de Fearon e Vongelstein de mutação genética que ocorre na progressão de adenoma para carcinoma.

Em 1993, um fenômeno conhecido como instabilidade de microssatélites (MSI) foi observado tanto no câncer de colo-retal hereditário não polipose (HNPCC) quanto no câncer colo-retal esporádico, mostrando uma via genética alternativa no desenvolvimento desse câncer^{44,45}.

A definição de microssatélites bem como a definição de instabilidade de microssatélites (MSI) já foi dada nos tópicos anteriores, sendo necessário apenas lembrar que a verificação de instabilidade nessa região nada mais é que uma verificação indireta de um defeito no sistema de reparo do DNA (MMR). O MMR humano inclui as seguintes proteínas: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 e hPMS2 e esse sistema é responsável pela identificação e excisão de anormalidades que ocorrem durante a replicação do DNA, anormalidade essa que pode ser representada por danos químicos e físicos ao DNA⁴².

É preciso completar que os microssatélites são regiões com um risco particular de mutação devido o deslizamento da enzima DNA-polimerase durante a replicação do DNA. A falha no corte nesse “erro de replicação” (RER) pode ocasionar uma mutação pontual ou ainda, a produção de proteínas inespecíficas para a finalidade de reparo (proteínas truncadas). É muito comum também afetar os genes que incluem ou estão diretamente ligados à região de microssatélites como TGFBR2, ILGF, E2F-4 e BAX^{46,47}. Esses genes são raramente mutados nos tumores que não demonstraram MSI⁴⁸.

Outros trabalhos mostraram que diversos tumores, nos quais se identificam também vias moleculares com acúmulo paulatino de mutações em genes fundamentais para a proliferação celular e apoptose (Quadro 9), como no caso do câncer colo-retal, podem demonstrar ainda uma extensa variedade no número de cromossomos, caracterizando dessa forma a aneuploidia e também uma extensiva perda de material genético, chamada de perda de heterozigosidade (LOH). Interessantemente a grande maioria das células cancerígenas positivas para MSI são diplóides e não mostraram perda de heterozigosidade (LOH). Isso reforça o conceito que existem duas vias distintas no desenvolvimento do câncer, uma via “supressora” postulada por Fearon e Vogelstein e outra via “mutante” representada pela instabilidade de microssatélites⁴².

MSI tem sido extremamente descrito em vários cânceres, e possui extrema relevância clínica já que os tumores que seguem a via “mutante”

podem comportar-se de maneira biológica diferindo daqueles tumores que seguem a via “supressora”⁴².

1.6.12 Definição Clínica de MSI e aplicação em HNPCC

O defeito genético também foi caracterizado por erro de replicação (RER+). Entretanto, inúmeros autores mostraram a dificuldade de caracterizar e classificar um tipo de câncer com esse fenótipo e, principalmente, mostrar a instabilidade de microssatélites envolvida no processo tumoral. Essa dificuldade é representada pelo extenso número de regiões de microssatélites e principalmente pelos *loci* a serem investigados em cada tipo de câncer^{35,42}.

Os resultados destas investigações podem ser apresentados como positivos ou negativos pela demonstração ou não de banda extra na eletroforese. Entretanto, investigações mais detalhadas podem pesquisar um maior número de microssatélites e também podem oferecer um maior detalhamento de acordo com a frequência de alterações entre os microssatélites estudados. Dessa maneira, os tumores colo-retais podem ser classificados entre aqueles com elevada frequência de instabilidade (H-MSI), baixa frequência de instabilidade (L-MSI) ou ainda sem instabilidade (MSS)³⁵.

Como existe uma certa confusão em relação aos resultados obtidos a partir da investigação de instabilidade de microssatélites, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos sugeriu que fossem pesquisados sempre cinco

microssatélites como marcadores⁴⁹. Mesmo assim, alguns autores acreditam que a pesquisa de um único microssatélite, denominado como BAT-26, pode ser suficiente para evidenciar a existência de MSI devido a sua elevada incidência de mutações nos tumores colo-retais, facilitando assim a elucidação clínica deste teste em maior escala³⁵.

Anteriormente, foi comentado que a MSI é um traço marcante no HNPCC. Tal patologia caracteriza-se por uma doença autossômica dominante a qual se associa cerca de 5% do total de câncer de colo-retal⁵⁰. A sua causa está ligada à inativação de um dos seis genes relacionados com o reparo do DNA (MMR). Dois genes estão especialmente envolvidos nesta síndrome, o hMSH2 e o hMLH1, uma vez que mutações nestes genes constituem cerca de 90% das alterações genéticas até o momento⁵¹. Os portadores de mutações nos genes de reparo desenvolvem câncer colo-retal em uma idade precoce, e ainda, os tumores comumente possuem localização proximal à flexura esplênica. Os indivíduos portadores dessa síndrome apresentam tendência para a ocorrência de lesões sincrônicas e metacrônicas⁵². Além disso, membros dessas famílias têm o risco elevado para inúmeras outras neoplasias, tais como de endométrio, intestino delgado, estômago, urotélio, pelve, renal e ovário, entre outras⁵³.

O diagnóstico de HNPCC pode ser realizado de duas maneiras: a primeira clínica, através do preenchimento dos critérios de Amsterdã (Quadro 10) e geneticamente, pela identificação de mutações dos genes de reparo do

DNA por seqüenciamento. Dificuldades para diagnóstico molecular na rotina de diversos serviços motivaram então o surgimento de critérios clínicos para uma possível triagem de casos cuja probabilidade pré-teste de se encontrar alterações moleculares sugestivas de MSI fossem suficientes para motivar um estudo molecular mais aprofundado. Assim, sugeriu-se os critérios de Bethesda (Quadro 11), que são menos restritivos que os de Amsterdã e a tendência atual para a investigação genética consiste em iniciar tal investigação nas famílias suspeitas com o estudo de instabilidade de microssatélites (MSI) e/ou imunohistoquímica para as proteínas de reparo do DNA, sendo essas formas de análise menos complexas, por conseguinte, menos onerosas e mais exeqüíveis que o sequenciamento⁵⁴.

Quadro 10 - Critérios de Amsterdã⁵⁴.

Pelo menos três casos de câncer de colo-retal, que preencham os seguintes critérios:

- Um membro seja parente em 1^o grau dos outros dois.
- Pelo menos duas gerações sucessivas acometidas.
- Pelo menos um dos casos de câncer de colo-retal diagnosticado abaixo dos 50 anos.

Polipose adenomatosa familiar deve ser excluída.

Quadro 11 - Critérios de Bethesda⁵⁴

Indivíduos com câncer que preencham os critérios de Amsterdã:

1. Indivíduos com dois cânceres relacionados com HNPCC, incluindo câncer de colo-retal metacrônicos e sincrônicos ou cânceres extra-cólicos associados.
2. Indivíduos com câncer de colo-retal e um parente de 1^o grau com câncer de colo-retal ou câncer extra-cólico relacionado com HNPCC e/ou adenoma colo-retal (um dos cânceres diagnosticado abaixo dos 45 anos e os adenomas abaixo dos 40 anos).
3. Indivíduos com câncer de colo-retal ou endometrial diagnosticado abaixo dos 45 anos.
4. Indivíduos com câncer de cólon direito com padrão histológico indiferenciado abaixo dos 45 anos.
5. Indivíduos com câncer de colo-retal com células em anel de sinete diagnosticado abaixo dos 45 anos.
6. Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos.

1.6.13 Aplicação de MSI em câncer de mama

Percebe-se que a aplicabilidade do estudo de instabilidade de microssatélites no HNPCC é vasta e extremamente importante do ponto de vista clínico e esse tipo de estudo, como citado anteriormente, passou a ser rotina na prática clínica em cânceres colo-retais.

Entretanto, no câncer de mama a informação a respeito de MSI é ainda controversa. A incidência reportada em alguns estudos varia entre 0 a 30%,

embora, provavelmente, menos que 10% apresentem H-MSI^{55,56}. Alguns autores sugeriram que ocorreria perda da expressão de hMLH1 em pacientes sob tratamento quimioterápico e que estas mesmas teriam também um pior prognóstico por uma redução de sua sobrevida livre de doença⁵⁵. Estudos complementares são necessários, portanto, para melhor aclarar o papel da MSI na carcinogênese mamária e suas implicações prognósticas neste tipo de tumor⁴².

1.6.14 Aplicação de MSI em outros tumores.

A instabilidade de microssatélites tem sido verificada em muitos tumores sólidos. Atualmente, a definição e a interpretação de instabilidade é reportada na literatura de maneira variável. Essa verificação está sendo feita principalmente em cânceres gástricos, endometriais e ovarianos⁴².

Nos tumores gástricos, alguns autores sugerem que há uma predominância de positividade do antro gástrico⁵⁷. Entretanto outros autores verificaram a presença de MSI em toda extensão gástrica⁵⁸. Já nos tumores ovarianos, a incidência de MSI varia de 3 a 53% e essa variação é atribuída de acordo com os tipos e os números de marcadores de microssatélites usados⁵⁹. Nos tumores endometriais, alguns estudos demonstram relação entre a presença de MSI e grau histológico avançado⁶⁰.

1.6.15 Aplicação de MSI em Leucemias.

A instabilidade de microssatélites também foi utilizada na avaliação de pacientes com Leucemias Mieloblásticas. Das-Gupta et al.⁶¹ observaram que nos pacientes com MSI ocorria também alta incidência de risco de anormalidades citogenéticas. Além disso, comprovaram que houve intensa relação de instabilidade com a idade dos pacientes estudados e assim descreveram que a MSI era mais freqüente em pacientes com idade superior a 60 anos⁶¹.

Verifica-se, entretanto, que não existe um painel de marcadores específico para determinar a presença de MSI em pacientes com LMA e, além disso, também inexiste um consenso acerca da metodologia que deve ser utilizada para determinar a instabilidade de microssatélites (MSI) nestes pacientes.

Recentemente, na tentativa de estreitar a relação entre o fenótipo RER + (presença de MSI) em pacientes com LMA, Faulkner et al.⁶² estudaram 3 marcadores com alta sensibilidade e especificidade para tal fenótipo em cânceres colo-retais (BAT-25, BAT-26 e BAT-40). Os autores perceberam que apesar de serem extremamente úteis na avaliação de câncer colo-retal, os mesmos foram considerados insensíveis para determinar essa condição em pacientes com LMA. Verificaram, portanto, que para relacionar a presença de MSI em pacientes com LMA, há a necessidade de se determinar um painel com marcadores de microssatélites sensíveis para essa condição⁶².

A instabilidade de microssatélites também foi verificada em pacientes com terapia relacionada para LMA/SMD. Tal verificação foi feita a fim de investigar o potencial papel do defeito no sistema de reparo como mediador de suscetibilidade leucemogênica. Oliptz et al.⁶³ avaliaram pacientes com LMA, SMD, ou ambos, para MSI como medida indireta do defeito no sistema de reparo e, na tentativa de verificar em qual estágio desenvolveu-se a MSI, também fizeram a mesma avaliação nos tumores primários de algumas dessas pacientes e sugeriram que o defeito no sistema de reparo do DNA confere a suscetibilidade leucemogênica, uma vez que as pacientes com MSI para LMA, SMD, ou ambos, também apresentaram MSI nos tumores primários⁶³.

Ainda sobre a relação de suscetibilidade ao desenvolvimento de leucemias agudas após terapia, principalmente após quimioterapia adjuvante em pacientes com leucemia mieloide aguda, alguns autores estabeleceram relação entre a presença de polimorfismos no gene hMSH2 (gene de reparo) e o aparecimento destas leucoses na evolução dos pacientes. Acreditam estes autores que os polimorfismos no gene hMSH2 confeririam maior suscetibilidade a leucemogênese induzida por agentes alquilantes administrados durante a adjuvância⁶⁴.

Além do hMSH2, outro gene, o hMLH1, também tem destaque dentro desse processo de suscetibilidade ao desenvolvimento de leucemias. De fato, a hipermetilação da região promotora desse gene e do hMSH2 vem sendo amplamente reportada como indicativa desta suscetibilidade. Sheikh et al.⁶⁵

avaliaram pacientes com LMA e SMD e além de encontrar alto índice de MSI, também verificaram a hipermetilação do gene hMLH1 que apesar de não ser comum nesse tipo de doença maligna, pode estar associada ao desenvolvimento de leucemias mielóides agudas mais precocemente nesses pacientes⁶⁵.

Baseado nesses dados, a indução de MSI pela quimioterapia adjuvante em células normais do sangue periférico pode nos dar subsídios adicionais para melhor compreender, em nível molecular, o processo de leucemogênese subjacente à geração de leucemias e mielodisplasias secundárias a quimioterapia adjuvante ministrada a pacientes com câncer de mama.

2 OBJETIVOS

- 1) Avaliar se a quimioterapia sistêmica induz instabilidade de microssatélites (MSI) em células normais da fração mononuclear do sangue periférico de pacientes com câncer de mama comparando-se amostra de sangue seqüenciais obtidas antes, durante e após indicação do tratamento sistêmico em cada paciente.
- 2) Avaliar correlações entre a ocorrência de MSI com o tipo de quimioterapia e demais variáveis clínico-patológicas das pacientes estudadas.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

No período entre maio de 2001 e novembro de 2002, as pacientes com diagnóstico de câncer de mama definitivamente estabelecido por exame anátomo-patológico, foram selecionadas em suas primeiras consultas junto aos ambulatorios de oncologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC e dos Hospitais afiliados e que são administrados pela mesma Fundação (Hospital Anchieta, Hospital Estadual “Mário Covas”). Nenhuma das pacientes havia recebido previamente quimioterapia ou radioterapia ou tido outra história prévia de neoplasia. As características e finalidades do estudo foram explicadas a todas as pacientes. As que optaram em participar assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Institucional (CEP) (Anexo 1).

As pacientes foram tratadas de acordo com os protocolos institucionais vigentes por ocasião de sua inclusão no estudo e de acordo com a indicação clínica realizada pelo médico oncologista que a assistia. O presente estudo ocorreu de forma paralela e independente do tratamento antineoplásico adotado para cada paciente, não influenciando desse modo as medidas diagnósticas ou terapêuticas empregadas.

Além das características clínicas consideradas anteriormente, o tratamento sistêmico também foi avaliado nas trinta pacientes elegíveis para o estudo, desse modo, 13 dessas pacientes receberam quimioterapia adjuvante, 12 neo-adjuvante e 5 paliativa. Todas as 30 pacientes receberam quimioterapia e ainda dessas, 3 iniciaram o tratamento com hormônios (2 adjuvante e 1 paliativa).

Dentro do tratamento sistêmico proposto foram feitas combinações de quimioterápicos contendo ciclofosfamida e com isso foram classificadas como agentes alquilantes: FAC (associação composta de fluoracil, adriamicina e ciclofosfamida), AC (adriamicina e ciclofosfamida), CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluoracil) e TAC (topoisomerase, adriamicina e ciclofosfamida) foram as combinações utilizadas durante o tratamento dessas pacientes.

Todas as pacientes admitidas no estudo tiveram uma amostra inicial de sangue coletada, previamente a exposição à quimioterapia ou radioterapia, considerada amostra padrão. Após a primeira coleta, a paciente era convocada novamente para outra coleta em um intervalo de três meses e assim sucessivamente durante o tratamento pela qual estava submetida, obtendo-se dessa maneira amostras seqüenciais da mesma paciente e possibilitando a comparação entra a amostra padrão e as demais amostras obtidas posteriormente. Os dados clínicos e anátomos-patológicos de cada paciente foram obtidos a partir de revisão dos prontuários médicos entre abril e maio de 2003.

Além das pacientes estudadas com as características descritas anteriormente, outro grupo composto por mulheres doadoras de sangue (livres de doença) foi considerado com o objetivo de obter-se controle externo no estudo.

Para cada mulher elegível a esse grupo, foi aplicado um questionário (Anexo 3) através do qual foi avaliado a história pessoal e familiar de cada doadora. Os seguintes critérios de exclusão foram seguidos: história pessoal confirmada ou suspeita, história familiar relacionada diretamente com câncer (filho, pais ou irmãos) e mais que 2 casos de câncer com idade inferior a 40 anos de idade para tumores de mama, ovário, cólon ou sarcoma na família (incluindo avós, tios, sobrinhos e netos). Foram coletadas duas amostras de sangue periférico com intervalo de 3 meses entre a primeira e a segunda amostra. As amostras foram tratadas igualmente às amostras das pacientes conforme será mostrado nesse capítulo.

3.2 Coleta de Sangue Periférico

Foram coletados 20,0 mL de sangue periférico de cada paciente por amostra. O procedimento foi feito através de punção venosa. Após coleta de sangue, no mesmo era realizado hemograma completo para avaliação da

contagem global de leucócitos, bem como a contagem diferencial dos mesmos com a finalidade de separá-los para os procedimentos consequentes.

3.3 Separação da Fração Mononuclear do Sangue Periférico

Após a contagem dos leucócitos, sua fração mononuclear foi separada utilizando Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB). Aos 20,0 mL de sangue periférico eram adicionados 20,0 mL de solução salina (NaCl 0,9%) respeitando a diluição volume/volume. A fração mononuclear foi obtida a partir dessa diluição.

Em um tubo tipo Falcon com capacidade para 15,0 mL, colocavam-se primeiramente 3,0 mL de Ficoll-Paque Plus e em seguida adicionavam-se 10,0 mL da diluição sangüínea, obtendo-se assim um sistema de soluções bifásicos e nitidamente separados. Esse sistema era submetido a centrifugação em temperatura ambiente, a 2000 rpm durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sistema que antes era bifásico passava a possuir quatro fases sendo de baixo para cima: hemácias, Ficoll-Paque Plus, fração mononuclear e plasma. A segunda fase contendo a fração mononuclear era retirada com o auxílio de pipeta Pasteur e transferida para outro tubo tipo Falcon para sucessivas

lavagens com a solução salina (NaCl 0,9%). A cada amostra foram realizadas duas lavagens de células.

Após lavagem, o concentrado celular era ressuspenso em 1,0 mL da mesma solução salina para as mesmas serem avaliadas e contadas através da Câmara de Neubauer e a concentração das mesmas eram ajustadas para 1×10^6 células / mL.

3.4 Extração de DNA da fração mononuclear

O DNA foi extraído da fração mononuclear utilizando-se Trizol^R (INVITROGEN, Garlsbad, CA, USA). O Trizol é um reagente pronto para uso, utilizado para a extração de RNA, DNA e proteínas de células e tecidos. Esse reagente é uma solução monofásica composta por fenol e isotiocianato de guanidina.

Foi adicionado 1,0 mL de Trizol a 1×10^6 células / mL que havia sido a concentração celular escolhida para dar início a esta etapa. A mistura foi colocada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. A essa mistura adicionou-se 200 µL de clorofórmio. A nova mistura foi homogeneizada e permanecia por três minutos em temperatura ambiente.

A preparação era submetida a centrifugação durante quinze minutos a 10.000 rpm em 4°C. Formou-se, após a centrifugação, um sistema trifásico: a primeira fase aquosa com RNA, a interfase com o DNA e a fase fenólica com proteínas. A fase aquosa foi retirada e às outras duas fases foi adicionado 300 µL de etanol absoluto e, a partir desse momento, já era possível a visualização do DNA.

Essa preparação era acondicionada a temperatura ambiente por 2 ou 3 minutos. As amostras foram centrifugadas sob 4°C a 5.000 rpm durante 10 minutos para sedimentação do DNA. Após esta sedimentação, foi realizada a lavagem do DNA. A lavagem seguia-se da seguinte forma: toda a solução sobrenadante era removida (correspondente a fase fenol-etanol) e acrescentava-se 1,0 mL de solução contendo 0,1 mol/L de citrato de sódio em etanol 10% (solução de lavagem). Após a adição dessa solução, a mistura era submetida a agitação leve com o auxílio de um agitador de Klinne (Fanem do Brasil) por 30 minutos. Após esse acondicionamento, o lavado era centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos sob 4°C. Essa etapa de lavagem do DNA foi realizada duas vezes. Depois dessas duas lavagens, o “pellet” de DNA foi dissolvido em 1,0 mL de etanol a 75%. Essa nova mistura era estocada por 15 minutos a temperatura ambiente com homogeneização periódica e depois se centrifugou a mesma a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Após completa lavagem do DNA, procedeu-se a secagem do mesmo utilizando-se liofilizador (Eppendorf). Tal procedimento foi realizado por 3

minutos a 60⁰ C e a finalização foi feita em solução de NaOH 8 mmol/L, sendo que o volume utilizado dessa solução dependeu da quantidade de DNA extraído de cada amostra. As amostras obtidas foram quantificadas utilizando espectrofotômetro GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Sweden), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foram utilizados somente preparados de DNA com relação A_{280}/A_{260} igual a 0,5. O DNA foi então armazenado a 4°C até o seu posterior processamento.

3.5 Detecção da Instabilidade de Microssatélites (MSI)

3.5.1 Regiões de microssatélites estudadas

Foram estudadas 6 regiões de microssatélites em todas as amostras de DNA que foram extraídas conforme descrito anteriormente.

Dietmaier et al.⁶⁶ descreveram um painel com 31 marcadores de microssatélites, bem como a localização cromossômica dos mesmos e a aplicabilidade clínica da variação de cada região repetitiva no câncer de colo-retal⁶⁶. A partir daí definiu-se os marcadores a serem estudados nas amostras das pacientes incluídas no estudo. Os marcadores estudados foram:

⇒ Dois *loci* com repetições mononucleotídicas: *BAT-40* E *BAT-26*.

⇒ Três *loci* com repetições “CA” dinucleotídicas: *MFD-41*, *MFD-28* e *TP53PCR*.

⇒ Um *locus* com repetições pentanucleotídicas: *TP53ALU*.

A localização cromossômica das regiões citadas anteriormente, bem como as seqüências de “primers” utilizadas na reação da polimerase em cadeia estão descritas na tabela 1⁶⁶.

Tabela 1 – Características gerais das regiões de microssatélites estudadas.

Nome (Locus)	Localização cromossômica	Repetições de nucleotídeos (*)	Seqüência dos primers (5'para 3')	Temp. de anelamento (°C)	Tam.do Fragmento (bp)
<i>BAT-26</i>	2 p	(T) ₅(A) ₂₆	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	58	80-100
<i>BAT-40</i>	1p13.1	TTTTTT...(T) ₇ TTT.(T) ₄₀	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC GTA GAG CAA GAC CAC CTT G	58	80-100
<i>MFD-41</i>	17p12-11.1	(CA) ₁₆	CAG GTT CTG TCA TAG GAC TA TTC TGG AAA CCT ACT CCT GA	58	157-171
<i>MFD-28</i>	10p	(CA) ₃₂	AAC ACT AGT GAC ATT ATT TTC AGC TAG GCC TGA AGG CTT CT	55	142-156
<i>TP53PCR</i>	17p13.1	(A) ₁₄ GAAAAGAAAAGA AAA...	AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C	65	103-135
<i>TP53ALU</i>	17p13.1	(AAAAT) ₈ (A) ₇ GAAAA	GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG	58	400

3.5.2 Amplificação das regiões de microssatélites estudadas

Para a realização da amplificação das regiões de microssatélites, foi utilizada a reação da polimerase em cadeia (PCR). A reação de PCR teve um volume de 25 μ L contendo 20 ng de DNA, 10 pmol de cada “primer” para as regiões *TP53ALU*, *TP53.PCR15.1*, *BAT-26*, *BAT-40*, *Mfd41* e *Mfd28CA*, 200 μ mol/L de dioxinucleosídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mmol/L $MgCl_2$, 1x tampão da enzima (Amersham, Pharmacia), 1 UI Taq polimerase e água deionizada e bidestilada autoclavada até completar o volume. O material foi submetido ao protocolo de amplificação constituído de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento em temperaturas que variavam de 55 a 65 °C, dependendo da região estudada (Tabela 1) e 1 minuto de extensão a 72 °C. A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MJ Research PTC 200, USA). Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo, isto é, todos os reagentes exceto o DNA.

Após a amplificação as amostras foram analisadas em gel de agarose 2%, para verificação de amplificação das frações *TP53ALU*, *TP53.PCR15.1*, *BAT-26*, *BAT-40*, *Mfd41* e *Mfd28CA*. O gel foi analisado através da transiluminação com luz UV, onde os fragmentos esperados foram previamente descrito na tabela 1.

3.6 Verificação de MSI e LOH nas amostras amplificadas

Após verificação da amplificação em gel de agarose, adicionava-se formamida para a denaturação das amostras amplificadas. O processo era completado com aquecimento da mistura (amostra amplificada e formamida) a 94 °C durante 5 minutos. Após aquecimento, essa mistura era colocada imediatamente no gelo para seguinte aplicação em gel de poliacrilamida.

O gel de poliacrilamida era um gel pronto (Gene Gel Clean 15/24 kit - Amersham Pharmacia Biotech), e necessitava de hidratação prévia com a solução hidratante contida no kit do mesmo por 1 hora. Esse gel possuía a capacidade para aplicação de 24 amostras e após hidratação ficava com as seguintes dimensões: 123 x 110 x 0,5 mm. O sistema de análise utilizado permite uma separação eletroforética para amostras amplificadas que variam de 50-1500 pares de bases (pb), com uma resolução de 6 pb em fragmentos amplificados entre 50-200 (pb). Consequente a denaturação, aplicava-se 6,0 µL da mistura mencionada acima para corrida eletroforética nas condições: 600 V, 15 mA, 9 W por aproximadamente 1 hora e 20 minutos o que garantia a completa corrida das amostras. A corrida eletroforética foi realizada com a utilização do sistema GenePhor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) que permitia o controle de temperatura de todo o procedimento. A temperatura adotada para todas as corridas eletroforéticas foi 12 °C. Terminada a

eletroforese, o gel era submetido à coloração com nitrato de prata para visualização dos resultados obtidos no trabalho.

A coloração do gel foi realizada seguindo o protocolo de instruções de DNA Silver Staining Kit (Pharmacia Biotech) no aparelho Hoefer Automated Gel Satainer (Pharmacia Biotech). O processo de coloração utilizou quatro soluções de tratamento do gel para posterior visualização de MSI e LOH. O seguinte protocolo foi aplicado e adaptado para tal procedimento: o gel permanecia na solução de fixação (3% ácido benzeno-sulfônico em solução alcoólica a 24%) por 30 minutos. A solução era retirada e colocava-se outra solução que era a solução de coloração (1% de nitrato de prata, 0,35% de ácido benzeno-sulfônico). O gel permanecia nessa solução por 30 minutos. Em seguida era realizada uma lavagem por 1 minuto com água destilada e nesse momento adicionava-se a solução de revelação (12,5% carbonato de sódio, 37% de formaldeído e 2% de tiosulfato de sódio) por 6 minutos. Após a revelação, o gel era conservado por 30 minutos utilizando a solução de conservação (5% de ácido acético, 25% acetato de sódio e 50% de glicerol). Para finalizar o procedimento, secava-se o mesmo com auxílio de papel lenço e posteriormente em estufa a 37°C por 24 horas.

Depois de todo o processo analítico, a MSI foi considerada quando ocorria um aparecimento de uma banda “anexa” ao fragmento amplificado e LOH foi considerada quando houve um desaparecimento da banda que correspondia ao material amplificado, sempre comparando as amostras

colhidas seqüencialmente de cada paciente e considerando a primeira amostra da mesma como padrão de normalidade na corrida eletroforética. Essa análise foi realizada por três observadores independentes em momentos diferentes de realização desse estudo.

3.7 Análise Estatística

Foram utilizados o teste de quiquadrado e exato de Fisher para relacionar variáveis discretas entre si e o análise de variância (ANOVA) para avaliar correlações entre variáveis contínuas e discretas entre si. Não foram conduzidas análises multivariadas pelo pequeno número de pacientes. Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa estatístico NCCS.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas das pacientes

Após avaliação clínica e confirmação histopatológica de câncer mama, foi explicado o fluxograma do trabalho e aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido nas pacientes, assim foram incluídas trinta e três pacientes e pelo menos uma amostra de sangue foi coletada de cada paciente em questão. A mediana da idade dessas pacientes incluídas no estudo foi de 52, sendo que esse dado variou de 25 a 80 anos.

O objetivo do trabalho foi acompanhar o tratamento dessas pacientes, através da coleta de sangue durante o tratamento sistêmico. Dessas trinta e três pacientes incluídas, só foram consideradas trinta, pois duas perdeu-se o seguimento e uma retirou o consentimento, obtendo-se apenas a amostra de sangue antes do tratamento proposto pelo clínico e não servindo como base de análise para MSI e LOH, já que não havia forma de comparação para tais parâmetros. A mediana de tempo de seguimento foi de 9 meses (variando de 3 a 46 meses).

Sobre as pacientes elegíveis, ou seja, que tiveram pelo menos duas amostras de sangue coletadas possibilitando a avaliação de MSI e LOH, obteve-se os seguintes resultados clínicos quanto ao estadiamento, 12 possuíam o estadio II, 13 o estadio III e 5 o estadio IV. O tipo ductal invasivo estava presente em 83% das pacientes quando se avaliou o tipo histológico. O

tamanho do tumor variou de 1,0 a 9,0 cm obtendo-se 5,5 como mediana para esse dado clínico.

Quanto aos marcadores prognósticos de imuno-histoquímica, 24,1% expressaram c-erb-B2 e 41,4% apresentaram positividade tanto para receptores de estrógeno quanto para receptores de progesterona.

A seguir, a Tabela 2 mostra os dados clínicos das trinta pacientes elegíveis para detecção de MSI e LOH.

Tabela 2 – Características das pacientes.

Idade* (anos)	52 (25-80)
Histologia (% de ductal invasivo)	83
Estadio (%)	
II	40,0
III	43,3
IV	16,6
Tamanho do Tumor* (cm)	5,5 (1-9)
c-erb (% de positivos)	24,1
Receptor de Estrógenos (% de positivos)	41,4
Receptor de Progesterona (% de positivos)	41,4
* Mediana (variação)	

A seguir o gráfico 1 ilustra a distribuição das pacientes de acordo com o tratamento sistêmico proposto pelos clínicos.

Gráfico 1 - Distribuição das pacientes em relação ao tratamento sistêmico.

O grupo controle foi composto por 20 mulheres que haviam preenchido o questionário (Anexo 3), bem como os critérios de inclusão e não apresentavam nenhuma história médica relevante.

4.2 Características laboratoriais das pacientes

4.2.1 Verificação da amplificação das regiões de microssatélites

Antes de apresentar os resultados obtidos das análises dos géis de prata, é preciso ressaltar e ainda mostrar a seqüência de trabalho realizada para tal análise. Dessa maneira, a seguir será explicado o resultado da metodologia utilizada para estudar MSI e LOH.

Em virtude da inclusão de 33 pacientes no estudo e realização da reação de polimerase em cadeia (PCR) para 6 regiões de microssatélites, foram feitas aproximadamente 800 reações de PCR.

Conforme citado em Pacientes e métodos (capítulo 3), após amplificação das regiões de microssatélites, a mesma era verificada para cada região através de gel de agarose a 2%. Assim, o material amplificado (5,5 µL) era adicionado ao corante (1,5 µL) e aplicado no gel para tal análise. Todas as amostras tiveram a amplificação verificada, a figura 7 ilustra a amplificação dessa verificação para a região *TP53ALU* enquanto que a figura 8 mostra a amplificação para a região *TP53PCR* ambos com localização no cromossomo 17.

Figura 7 - Ilustração da amplificação e conseguinte verificação em gel de agarose 2% para a região *TP53ALU*.

Legenda: A figura 7 ilustra 13 amostras amplificadas para a região TP53 ALU. Notar a região amplificada em 400 pb comparando-se ao final com o marcador de peso molecular de 100 pb (última amostra aplicada no gel à direita).

Figura 8 - Ilustração da amplificação e conseguinte verificação em gel de agarose 2% para a região *TP53PCR15.1*.

Legenda: A figura 8 ilustra 13 amostras amplificadas para a região *TP53PCR15.1*. Notar a região amplificada em aproximadamente 120 pb comparando-se ao final com o marcador de peso molecular de 100 pb (última amostra aplicada no gel à direita).

4.2.2 Verificação de MSI e LOH em gel de poliacrilamida

Após verificação das amplificações, também foi citado que o material amplificado para cada região, passou por um processo de denaturação com formamida e essa mistura era aplicada no gel de poliacrilamida, para a verificação de MSI e LOH. As amostras eram agrupadas por pacientes, sendo aplicadas nesse gel da seguinte maneira: a primeira amostra que correspondia a amostra da paciente sem tratamento prévio e na sequência eram aplicadas as amostras que haviam sido colhidas durante o ciclo de tratamento da paciente, possibilitando assim a comparação entre as amostras de cada paciente incluída no estudo.

Todas as reações amplificadas (aproximadamente 1000) foram verificadas em gel de poliacrilamida para estudo de MSI e LOH. O gel mencionado possuía a capacidade para 24 amostras, dessa maneira aproximadamente 90 géis foram feitos durante o trabalho.

A seguir para elucidação de MSI e LOH, foram selecionados os géis que continham MSI (aparecimento de banda anexa) e LOH (desaparecimento de banda) de algumas pacientes (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Figura 9 - Gel de Poliacrilamida – Verificação de MSI na região *TP53ALU*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente IMMP. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras cinco amostras correspondem às coletas da mesma paciente em tratamento quimioterápico. Notar aparecimento da banda anexa na terceira amostra classificada como instabilidade de microssatélites (MSI) para a região *TP53ALU*.

Figura 10 - Gel de Poliacrilamida – Verificação de LOH na região *TP53PCR15.1*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente IMMP. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras cinco amostras correspondem às coletas da mesma paciente em tratamento quimioterápico. Notar que a partir da segunda amostra até a sexta amostra houve desaparecimento de banda anexa quando comparada com a amostra padrão, isso caracterizou a perda de heterozigosidade (LOH) para a região *TP53PCR15.1*. É preciso ressaltar que tal fenômeno persistiu nas demais amostras (amostras 3, 4, 5, 6).

Figura 11 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região *BAT-40*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente TL. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras cinco amostras correspondem às coletas da mesma paciente em tratamento quimioterápico. Notar aparecimento da banda anexa na terceira amostra classificada como instabilidade de microssatélites (MSI) para a região *BAT-40*.

Figura 12 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região *BAT-26*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente FKN. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras seis amostras correspondem às coletas da mesma paciente sob tratamento quimioterápico. Notar aparecimento de banda anexa na segunda amostra classificada como instabilidade de microssatélites (MSI) para a região *BAT-26*.

Figura 13 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região *MFD-41*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente EN. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras seis amostras correspondem às coletas da mesma paciente sob tratamento quimioterápico. Notar aparecimento de banda anexa na terceira amostra classificada como instabilidade de microssatélites (MSI) para a região *MFD-41*.

Figura 14 - Gel de poliacrilamida – Verificação de MSI na região *MFD-28*

Legenda: Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras da paciente FKN. A primeira amostra à esquerda corresponde à situação da paciente sem tratamento sistêmico (amostra padrão), as outras seis amostras correspondem às coletas da mesma paciente sob tratamento quimioterápico. Notar aparecimento de banda anexa na segunda amostra classificada como instabilidade de microssatélites (MSI) para a região *MFD-28*. Essa região foi a que apresentou pior performance de visualização de MSI no gel de poliacrilamida, conforme mostrado na figura acima.

4.2.3 Resultados das análises dos géis de poliacrilamida

Os resultados obtidos com base nas análises dos géis foram agrupados na tabela 1 (Anexo 2), para facilitar a visualização dos mesmos. A tabela agrupa cada paciente, bem como as amostras pertencentes a cada uma e as alterações analisadas em gel de poliacrilamida para cada marcador estudado, conforme visualização e exemplos nas figuras anteriores.

Como citado anteriormente, das 33 pacientes colocadas na tabela foram avaliáveis para tais descrições 30 pacientes. O total de 122 amostras corresponderam as 33 pacientes e o total de 119 amostras as pacientes pela qual foi possível a avaliação de MSI e LOH. Portanto, serão apresentados a seguir os resultados das 119 amostras, já que 3 não foram elegíveis para o estudo conforme justificativa citada no início desse estudo.

Das 119 amostras elegíveis de verificação de LOH e MSI, 30 correspondiam às amostras das pacientes sem tratamento, chamadas de amostras padrões, toda a base de comparação de aparecimento ou desaparecimento de banda anexa foi feita com essas amostras. Com isso se 30 amostras correspondiam ao padrão na corrida eletroforética, o restante correspondendo a 89 amostras foram obtidas das pacientes durante o tratamento sistêmico. Desse modo, foi possível avaliar diretamente o efeito do tratamento nas amostras colhidas e estudadas conforme citado na sessão de Pacientes e Métodos.

Das 30 pacientes, foi verificado o aparecimento (MSI) ou desaparecimento de banda anexa (LOH) em 27 pacientes traduzindo

verificação de instabilidade genética para as regiões estudadas em 90% das pacientes. Esse mesmo dado aplicado ao total de amostras coletadas, indicou que das 119 amostras obtidas, em pelo menos 40 ocorreu o aparecimento ou desaparecimento de banda anexa, isso representa que 34% do total das amostras coletadas apresentaram instabilidade genética, sendo essa classificada como MSI ou como LOH.

A instabilidade de microssatélites (MSI) ocorreu na maioria das amostras. Das 40 amostras que apresentaram instabilidade, 34 foram classificadas como MSI (instabilidade de microssatélites) e 6 como LOH (perda de heterozigosidade). Outra análise que evidencia tal fenômeno biológico é que a MSI apesar de ser mais freqüente era transitória, ou seja, não persistia nas amostras subseqüentes ocorrendo o mesmo efeito de corrida eletroforética que a amostra padrão. Já a LOH evidenciou um fenômeno persistente em 5 das 6 amostras, ocorrendo o desaparecimento da banda anexa e persistindo nas amostra seguintes e ainda das 5 amostras com a classificação LOH, em 4 ocorreu na região *TP53PCR15.1*.

O estudo propôs a verificação de instabilidade genética em seis regiões diferentes para microssatélites. A característica de nucleotídeos repetidos, bem como a localização cromossômica de cada região foi citada na Tabela 1 da sessão Pacientes e Métodos. É necessário destacar a freqüência de positividade dessas regiões em relação às pacientes estudadas nesse trabalho. Dessa maneira, a seguir o gráfico 2 explica essa relação, mostrando que das seis regiões de microssatélites estudadas nessas pacientes, as regiões

TP53 e *ALU* foram as que apresentaram maior índice de positividade entre as pacientes consideradas positivas para a análise de instabilidade genética (MSI e LOH).

Gráfico 2 - Distribuição das pacientes em relação à positividade das regiões de microssatélites estudadas.

Outra relação pôde ser feita quando as pacientes foram avaliadas em relação à quantidade de regiões consideradas positivas. Como citado anteriormente das 30 pacientes, 27 foram positivas. Porém, o padrão de quantidade de regiões consideradas positivas não foi o mesmo para essas 27 pacientes. Assim, 63% dessas pacientes apresentaram somente uma região

com instabilidade, 10% foram consideradas estáveis e 27% apresentaram duas regiões com instabilidade genética. Quando se avaliou três, quatro, cinco e seis regiões ao mesmo tempo para cada paciente, foi possível verificar que nenhuma das pacientes com instabilidade apresentou mais de duas regiões positivas. Baseado nesse contexto, o gráfico a seguir (gráfico 3) relaciona as pacientes com a quantidade de regiões consideradas instáveis.

Gráfico 3 - Distribuição das pacientes em relação à quantidade de regiões consideradas instáveis.

4.3 Avaliação estatística dos resultados

Para a avaliação estatística foi realizada a seguinte tabela pela qual possibilitou visualizar a dispersão das amostras em relação ao tipo de tratamento sistêmico. Desse modo, a tabela 3 relaciona todas as amostras consideradas positivas e a fase de tratamento pela qual as amostras foram colhidas das pacientes.

Tabela 3 - Tipo de Tratamento sistêmico com MSI.

Presença de instabilidade/Tipo de tratamento	Antes do tratamento	Alquilante	Não alquilante	Rxt	Htx	Após o tratamento	Total de amostras
Presente	1	13	5	1	13	7	39
Ausente	0	8	5	8	13	15	49
Somatórias	1	21	10	9	26	22	89

Apenas uma amostra apresentou instabilidade genética antes do tratamento. As demais amostras consideradas positivas para a avaliação de instabilidade foram dispersas de acordo com a finalidade terapêutica, surgindo na avaliação final seis grupos de distribuição das amostras. Os grupos considerados foram: antes do tratamento, tratamento sistêmico com agentes alquilantes, tratamento sistêmico sem agentes alquilantes, radioterapia, hormonioterapia e fora do tratamento. O total de amostras consideradas

positivas para instabilidade genética, incluindo instabilidade de microssatélites (MSI) e perda de heterozigosidade (LOH), foi 89.

Obteve-se a seguinte correlação significativa entre o número de eventos de instabilidade de microssatélites por amostra e o uso de quimioterápicos ($p = 0,005$), principalmente se o sistema quimioterápico continha agentes alquilantes ($p < 0,0001$). O gráfico 4 demonstra a relação estágio de tratamento e quantidade de amostras positivas. Nota-se que quando o tratamento continha agentes alquilantes, o evento instabilidade de microssatélites foi mais expressivo.

Gráfico 4 - Estágio de tratamento sistêmico e amostras com instabilidade de microssatélites.

A avaliação de radioterapia possibilitou outra correlação significativa. No mesmo gráfico anterior, nota-se que as amostras obtidas das pacientes quando as mesmas estavam sob tratamento radioterápico apresentaram um menor número de eventos de instabilidade de microssatélites ($p = 0,038$).

Não foi verificada significância quando se correlacionou a perda de heterozigosidade (LOH) e os tipos de tratamento. As amostras consideradas positivas para LOH, quando relacionadas com a presença ou ausência de quimioterápicos, apresentaram um p igual a 0,818. Quando os quimioterápicos eram alquilantes, o p foi igual a 0,173. Quando relacionou-se as amostras positivas para a LOH e a ausência ou presença de radioterapia, o p encontrado foi de 1,0.

4.4 Características laboratoriais do grupo controle externo

Foram obtidas duas amostras de cada mulher com intervalo de 3 meses e como foram consideradas 20 mulheres livres de doença, esse grupo totalizou 40 amostras para o estudo. As regiões estudadas foram TP53ALU e TP53PCR15.1 nas mesmas condições em que foram submetidas as amostras das pacientes com câncer de mama. A seguir, os géis de poliacrilamida para as doadoras mostram que apenas uma mulher apresentou instabilidade de microssatélites para a região TP53PCR15.1.

Figura 15 – Gel de poliacrilamida para a região PCR15.1

Figura 16 – Gel de poliacrilamida para a região TP53ALU

Legenda: Cada amostra de doadora corresponde a uma letra, A representa a primeira amostra da doadora de número 1 e A1 representa a segunda amostra também da doadora de número 1 obtida após 3 meses da primeira coleta. Nota-se somente 1 caso (S/S1) pela qual verifica-se banda anexa ao material amplificado para a região PCR15.1 (Figura 15) e TP53ALU (Figura 16)

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo constatamos que as células da fração mononuclear do sangue periférico são susceptíveis a alterações genéticas quando expostas a regimes quimioterápicos, especialmente aqueles contendo agentes alquilantes, uma vez que obtivemos importante correlação entre o número de eventos de instabilidade de microssatélites observados em amostras de sangue obtidas durante o tratamento quimioterápico com tais agentes. Tais achados poderiam explicar a predisposição que alguns destes pacientes vêm a desenvolver, como mielodisplasias e leucemias secundárias, anos após o término da quimioterapia. Tais neoplasias secundárias exibem uma maior frequência de MSI do que leucemias agudas e mielodisplasias não relacionadas à quimioterapia.

Maneval et al.⁶⁷ avaliaram os efeitos da reatividade do oxigênio e dos agentes alquilantes na indução de MSI a fim de verificar a proficiência do MMR (sistema de reparo) em células humanas. Estes autores demonstraram também que as células linfoblásticas utilizadas nestes experimentos eram susceptíveis de indução a MSI quando as mesmas eram tratadas com agentes alquilantes, talvez sinalizando uma menor eficiência do sistema de reparo de DNA em células desta linhagem⁶⁷. É interessante neste contexto asseverar que a maior parte da fração mononuclear por nós estudada é composta de células linfóides.

Existem também na literatura outros estudos que investigam o dano ao DNA endógeno pela indução de MSI em células humanas tumorais (linhagens celulares) após a aplicação de esquemas terapêuticos, comprovando que pode

ocorrer a indução de MSI em células normais submetidas a tratamento quimioterápico^{68,69}. De fato, em nosso estudo evidenciamos que cerca de 90% das amostras de sangue coletadas apresentam positividade para a instabilidade genética, mostrando que talvez exista uma deficiência do sistema de reparo destas células quiçá induzida pela própria quimioterapia. Também, em nosso laboratório, observamos a diminuição significativa da expressão de hMSH2 nas células da fração mononuclear do sangue periférico após exposição destas células a agentes alquilantes (dados não mostrados).

As ações farmacológicas mais importantes dos agentes alquilantes são aquelas que perturbam os mecanismos fundamentais que se ocupam com a proliferação celular, em particular a síntese de DNA e a divisão celular. A capacidade destas drogas de interferirem com a integridade e função do DNA, nos tecidos em proliferação rápida, fornece a base para as suas aplicações terapêuticas e em muito para as suas propriedades tóxicas. Conquanto certos agentes alquilantes podem ter efeitos lesivos sobre os tecidos, com índices mitóticos normalmente baixos (por exemplo: fígado, rins e linfócitos maduros) eles são mais citotóxicos para os tecidos de proliferação rápida nos quais uma grande proporção das células está em divisão. Assim, a alquilação do DNA em si mesma pode não ser um evento letal, se as enzimas de reparo do DNA puderem corrigir as lesões do DNA antes da divisão celular seguinte⁷⁰.

Em contraste com muitos outros agentes antineoplásicos, os efeitos das drogas alquilantes, ainda que dependentes da proliferação, não são específicos para nenhuma fase do ciclo celular, sendo que estas drogas podem atuar sobre

as células em qualquer fase do ciclo. Entretanto, a toxicidade geralmente é expressa quando a célula entra na fase S e a progressão através do ciclo é bloqueada. O mecanismo real da morte celular relacionada com a alquilação do DNA não está bem compreendido. O fato é que há evidências de que, em células da medula óssea e do epitélio intestinal, o dano ao DNA ativa um ponto de controle do ciclo celular dependente da presença de um gene P53 normal. As células assim bloqueadas na interface G1/S reparam a alquilação do DNA ou sofrem apoptose. As células malignas com P53 mutante ou com perda de sua atividade deixam de suspender a progressão do ciclo celular e não sofrem assim apoptose⁷⁰.

Os agentes alquilantes quimioterápicos possuem como ação química a propriedade de se tornarem eletrófilos fortes, através da formação de intermediários de íon carbônio ou de complexos de transição com as moléculas – alvo. Estas reações resultam na formação de ligações covalentes pela alquilação de vários componentes nucleofílicos como os grupos fosfato, amino, sulfidril, hidroxila, carboxila e imidazol. Dessa maneira, os efeitos quimioterápicos e citotóxicos são diretamente relacionados com a alquilação do DNA. O átomo de nitrogênio 7 da guanina é particularmente suscetível à formação de um laço covalente com os agentes alquilantes e pode muito bem representar o alvo chave que determina os efeitos biológicos destes agentes. Entretanto, outros átomos nas bases purínicas e pirimídicas do DNA também podem ser alquilados em menor grau, do mesmo modo que os átomos de fosfato das cadeias do DNA e as proteínas associadas ao DNA⁷¹.

Um outro fator importante, relacionado aos alquilantes é a resistência adquirida a esses agentes, sendo que a aquisição de resistência nem sempre confere resistência cruzada a outros⁷⁰. Curiosamente, a indução de instabilidade de microssatélites, como a observada nesse trabalho, poderia explicar em parte o mecanismo de resistência adquirido durante o tratamento quimioterápico. Sabe-se que os complexos enzimáticos envolvidos no sistema de reparo do DNA (MMR) formam um importante mecanismo de resposta reparativa das células sob efeito genotóxico da quimioterapia na ocasião em que esta produz dano ao DNA⁷². Alguns agentes alquilantes mostram menor capacidade de destruição em células MSI positivas quando comparadas as células com o sistema de reparo (MMR) normal^{71,72}. Muitas das drogas alquilantes atuam causando a metilação da posição O⁶ da guanina (O⁶ metilguanina) que é usualmente reparada pela enzima O⁶ metilguanina-DNA metil transferase (MGMT)⁷⁵. As células que possuem deficiência nessa enzima são, portanto altamente sensíveis a esses agentes. Essa sensibilidade pode ocorrer devido o reconhecimento da base O⁶-meGuanina-timina pelo complexo hMSH2/hMSH6⁷⁶ pela qual ativam a apoptose. Dessa forma, o sistema de reparo do DNA identifica o dano, mas não é capaz de repará-lo e o ciclo celular será interrompido na fase G2/M, desviando tal ciclo para a via dependente do p53 ocasionando a apoptose^{77,78}. Assim as células que possuem deficiência tanto de MGMT quanto de MMR são 50-100 vezes mais resistentes aos agentes quando comparadas às células com o funcionamento normal do sistema de reparo⁷⁹. Desse modo a indução de MSI e talvez devida à

diminuição da expressão do gene de reparo hMSH2 (dado não mostrado) poderia se relacionar ao desenvolvimento de resistência do tumor ao tratamento quimioterápico.

Corroborando esta suposição, De las Alas et al. em 1997 demonstraram que há aumento de mutações em linhagens celulares deficientes de MMR expostas a agentes alquilantes produzindo-se também resistência aos seus efeitos anti-neoplásicos⁸⁰. Tais achados também foram reportados em células de câncer de ovário que além de apresentar deficiência no sistema de reparo se revelaram também resistentes ao tratamento baseado em agentes alquilantes⁸¹.

Adicionalmente, os agentes alquilantes são altamente leucemogênicos. Leucemia mielóide aguda e mielodisplasia, muitas vezes associadas com deleções parciais ou totais dos cromossomos 5 e 7, chegam ao seu máximo de incidência cerca de 4 anos após terapia e pode afetar até 5% dos pacientes tratados com esquemas contendo agentes alquilantes. O melfalan, as nitrosuréias e o agente metilante procarbazina têm a maior propensão a causar leucemia, enquanto a ciclofosfamida é menos potente a este respeito^{70,71}. Curiosamente, a leucemia mielóide aguda e mielodisplasia secundárias a quimioterapia têm incidência muito maior de MSI do que as leucemias de novo^{63,64,65} e é caracterizada por importante quimioresistência. Desta forma, é possível que a indução de MSI induzida por agentes alquilantes em células do sangue normais de pacientes com câncer de mama possa participar do processo de leucemogênese induzido pela quimioterapia antineoplásica e ainda contribuir para a sua característica quimioresistência.

Além do tratamento quimioterápico, também avaliamos os eventos de microssatélites quando as amostras foram colhidas com as pacientes em radioterapia. Constatou-se que estas amostras apresentaram menor número de eventos de instabilidade de microssatélites diferentemente das amostras avaliadas em tratamento quimioterápico.

Alguns estudos *in vitro* sugerem pouca, mas significativa resistência em relação à radiação ionizante em células de linhagens com sistema de reparo (MMR) deficiente^{82,83} e evidenciaram que o dano ao DNA é causado pela radiação ultravioleta e é reparado mais vagarosamente em células com deficiência de reparo. Outro estudo não encontrou relevância estatística na resposta à radioterapia de câncer colo-retal MSI positivo e câncer colo-retal estável⁸⁴. Os nossos achados constatarem que a radioterapia parece afetar pouco o sistema de reparo e provavelmente o dano causado pela radiação ionizante ao DNA é representado na forma de quebras de filamentos^{85,86} e a mesma parece não afetar o sistema de reparo do DNA⁴². Além do que é importante ressaltar que a radioterapia é um tratamento loco regional, não afetando as demais regiões além tumor.

Em contraste com a relativa escassez de trabalhos versando sobre a indução de MSI em células normais, é evidente entre os autores a preocupação em estudos de MSI em DNA tumoral^{55,87-94}. Como nosso estudo foi focado na indução de MSI em células normais, fica extremamente difícil comparar os dados obtidos em nosso trabalho com aqueles obtidos na maioria dos estudos propostos com DNA tumoral de pacientes com câncer de mama. Em pacientes

com câncer de mama, várias linhas de pesquisa foram conduzidas com base na avaliação de MSI nos tumores de mama, a saber: classificar o câncer de mama como integrante da síndrome HNPCC^{87,88}, na recorrência do câncer de mama⁸⁹, como alteração primária na carcinogênese mamária⁹⁵, em diferentes tipos de tumores de mama (esporádico, familiar e hereditário)⁹⁰ e na agressividade e prognóstico da doença⁵⁵. Nestes estudos verifica-se uma grande variabilidade em relação à frequência de verificação de MSI no câncer de mama, bem como na proposição, objetivos dos estudos e ainda na classificação de MSI e LOH.

Essa variabilidade pode ser atribuída a heterogeneidade das amostras estudadas (DNA tumoral, DNA do sangue, DNA plasmático), painel de marcadores utilizados sem uniformidade e padronização de diferentes critérios de análises de verificação de positividade para MSI e LOH^{96,97}.

Em relação ao painel de marcadores de microsatélites adotado nesse estudo, não foi utilizado o mesmo painel padronizado e proposto para a verificação de instabilidade genética no câncer de mama⁹⁸, pois a nossa proposição não foi avaliar instabilidade no DNA tumoral e principalmente por esse painel ter sido proposto para uniformizar tal verificação e pela atribuição de que a instabilidade genética é tumor específico⁵⁶. Optou-se por utilizar relevantes marcadores de expressão no câncer de mama e principalmente de importante expressão na verificação de instabilidade genética na síndrome HNPCC⁶⁶.

Talvez a melhor inclusão feita dentro do painel de verificação de instabilidade genética, foi a sequência ALU, tal sequência foi descoberta e

descrita em meados dos anos 80, como sendo elementos inseridos dos quais eram as mais numerosas repetições intra-dispersas no genoma humano (acerca de 3 a 6% do DNA total). A avaliação dessa sequência é defendida como de alta sensibilidade, chegando até ser classificada como um estudo a parte da investigação de instabilidade genética^{99, 100, 101}. Isso se dá pelo motivo de que ao invés de se propor um amplo painel de marcadores, pode-se perfeitamente avaliar os efeitos genotóxicos, de progressão e comportamento da doença somente com esse marcador, devido a sua alta representatividade no genoma humano. Muito provavelmente, por esse motivo que no nosso estudo tal marcador representou 28,6% de positividade, destacando-se dos demais marcadores propostos em nossa avaliação.

Outro marcador de alta expressividade foi o BAT-40 que também apresentou 28,6% de positividade na nossa avaliação. Esse marcador, juntamente com o BAT-26 são de elevada sensibilidade para a verificação de instabilidade genética para a síndrome HNPCC³⁵ e alguns autores chegam a classificar como de extrema importância a sua utilização na verificação de instabilidade para o câncer de mama⁹⁵.

O marcador PCR 15.1 também foi de extrema importância, não pelo índice de positividade (11,4%) mas pela forte associação à perda de heterozigosidade. Quando avaliamos esse marcador para a classificação do evento genético em LOH e MSI, a LOH foi extremamente presente nesse marcador. Na literatura alguns autores chegaram as mesmas alterações,

associando a susceptibilidade desse marcador a perda de heterozigosidade quando avaliado para a instabilidade genética no câncer de mama¹⁰².

Os outros dois marcadores incluídos nesse estudo apresentaram baixa positividade. O MFD-41 (11,4%) e MFD-28 (5,7%), ambos são marcadores de repetições dinucleotídicas. Alguns autores chegam a relatar que a positividade de instabilidade de um estudo feita com marcadores dinucleotídicos pode ser extremamente baixa ou até mesmo nula, pois os artefatos da metodologia mascaram o aparecimento e/ou desaparecimento de alelos devido ao deslizamento de produtos à margem comum nessas repetições^{56,103}, e interessante, quando fomos visualizar tal evento genético nesses marcadores, obtivemos extrema dificuldade.

Quanto ao número de regiões instáveis, verificamos que 63% das amostras positivas foram instáveis somente para uma região e 27% foram instáveis para duas regiões. Alguns autores comentam que o fato das células apresentarem instabilidade em uma ou duas regiões, implica em uma ineficiência do sistema de reparo e não na sua completa inativação^{90,104}. O número de regiões instáveis também poderia ser aumentado se tivéssemos usado um número muito maior de microssatélites.

Outro fator que pode contribuir para as diferenças observadas com os demais trabalhos que avaliaram a presença de MSI no DNA tumoral reside também na metodologia escolhida para determinar tal fenômeno que, em nosso estudo, foi o gel de poliacrilamida^{87-93,103} e coloração do mesmo com prata. O fato é que alguns autores acrescentam a essa metodologia, o sequenciamento

das amostras que apresentaram a instabilidade genética para fins confirmatórios⁹⁰. O seqüenciamento genético das amostras que apresentaram instabilidade genética para o marcador ALU e PCR15.1 também foi realizado no nosso trabalho (dados não mostrados). Entretanto, o resultado não foi satisfatório uma vez que os “primers” utilizados não eram apropriados para essa avaliação e quando a análise foi feita no programa BIOEDIT, as extensões iniciais e finais eram excluídas, inviabilizando a verificação da seqüência de bases repetidas. Por esse motivo, optamos por não mostrar o seqüenciamento. Porém, para que não houvesse interpretação errônea, três observadores avaliaram a presença de banda anexa e o desaparecimento da mesma nos géis de poliacrilamida.

Alguns autores propõem outras metodologias com o intuito de melhorar a análise de verificação de instabilidade genética, com maior sensibilidade e sem a influência do observador no momento de analisar o aparecimento de banda anexa e/ ou desaparecimento da mesma. Murthy et al.¹⁰² utilizaram a metodologia FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) para avaliar a perda de heterozigossidade em 50 amostras de pacientes com câncer de mama. Essa metodologia é muito mais onerosa e essa avaliação só poderia ser realizada com intuito investigativo. A análise feita no nosso trabalho é válida e simplifica o resultado, podendo ser empregada rotineiramente³⁵.

Além disso, os resultados apresentados pelo grupo controle externo (composto por 20 mulheres não acometidas pela doença) também mostra que a técnica de verificação de MSI e LOH empregada nesse trabalho é eficaz e,

principlamente, a visualização da banda é inconfundível e não sofre interação com a sugestividade de classificação da instabilidade genética.

Esses aspectos abordados em relação à variabilidade dos resultados apresentados na literatura nos remete a outra importante observação, como citado anteriormente a grande maioria dos autores verificam tais eventos genéticos no DNA tumoral comparando com o DNA do sangue como tecido normal. Quando adotamos o modelo experimental comparativo inter-amostras, verificamos a suscetibilidade das amostras de sangue ao mesmo evento genético, portanto o mesmo pode não servir como base comparativa normal de instabilidade, principalmente quando esta comparação é realizada após instalação do tratamento quimioterápico.

Através da análise adotada e do modelo experimental proposto, concluímos que a quimioterapia antineoplásica, especialmente quando contém agentes alquilantes pode induzir MSI em células normais da fração mononuclear do sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Estes achados podem contribuir para explicar o surgimento futuro de mielodisplasias e leucemias agudas em alguns destes pacientes, bem como poderiam também ocorrer no próprio tumor em tratamento, explicando, em parte, a resistência à quimioterapia que freqüentemente se estabelece durante a evolução destes pacientes. O melhor entendimento deste fenômeno em nível molecular, bem como a possibilidade de sua prevenção com agentes citoprotetores, representam nossas futuras áreas de investigação no sentido de tentar evitar a

indução de MSI durante o tratamento com agentes alquilantes e suas possíveis consequências – leucemogênese e indução de resistência à quimioterapia.

6 CONCLUSÕES

- 1) O tratamento quimioterápico induziu a instabilidade de microssatélites em células da fração mononuclear do sangue periférico de pacientes com câncer de mama.
- 2) A indução de instabilidade de microssatélites correlacionou-se positivamente com a presença de agentes alquilantes no regime quimioterápico administrados às pacientes. É possível que a instabilidade de microssatélites induzida pela quimioterapia sistêmica possa contribuir para a gênese de leucemias secundárias e para a resistência tumoral à quimioterapia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2003. [citado 13/07/2004]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>
2. World Health Organization. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO Regions: estimates for 2000. [citado 13/7/2004]. Disponível em: http://www.who.int/entity/whr/2001/en/annex2_en.pdf.
3. Associação Brasileira de Registros de Câncer. [citado 13/07/2004]. Disponível em: <http://www.abrc.org.br/relatorios.html>
4. Brasil. Ministério da Saúde. Saúde da mulher: câncer de mama. [citado 13/07/2004]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=152
5. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Consenso para o controle do câncer de mama 2004. [citado abril 2004]. <http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>.
6. Nicoletti AGB, Lopes F, Franco PAB, Del Giglio A, Mazzei R, Faure R, FIC, Carpegani L, Zatta SM, Gertner SK. Experiência do serviço de quimioterapia da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC com pacientes portadoras de neoplasias mamárias. *Arq Med ABC* 1998; 1:17-9.
7. Barton MB, Harris R, Fletcher SW. Does this patient have breast cancer? The screening clinical breast examination: should it be done? How? *JAMA* 1999; 282:1270-80.

8. Baines CJ, Miller BA. Mammography versus clinical examination of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1997; 22:125-9.
9. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*. 2003; 361:296-300.
10. Fletcher SW, Elmore JG. Mamographic screening for breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:1672-80.
11. American College of Radiology. Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS™) 3^a ed. Reston, Va: American College of Radiology; 1998. [citado 14/07/2004]. Disponível em: http://www.acr.org/cgi-bin/fr?mast:masthead-products;text:/departments/stand_accred/birads-a.html.
12. Lee CH, Philpotts LE, Horvath LJ, Tocino I. Follow-up of breast lesions diagnosed as benign with stereotactic core-needle biopsy: frequency of mammographic change and false-negative rate. *Radiology* 1999; 212:189-94.
13. Liberman L, Feng TL, Dershaw DD, Morris EA, Abramson AF. US-guided core breast biopsy: use and cost-effectiveness. *Radiology* 1998; 208:717-23.
14. Koch HA, Azevedo CM, Boechat AL, Peixoto JE, Almeida CD. Radiologia da mama: qualidade em mamografia. *Radiol Bras* 1996; 29:257-69.
15. Jackman RJ, Nowels KW, Rodriguez-Soto J, Marzoni FA Jr, Finkelstein SI, Shepard MJ. Stereotactic, automated, large-core needle biopsy of

- nonpalpable breast lesions: false-negative and histologic underestimation rates after long-term follow-up. *Radiology* 1999; 210:799-805.
16. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Eslton CW. Pathological prognostic factors in breast cancer II. Histological type. Relation with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479-89.
17. Rosen PP, Groshen S, Kinne D, Norton L. Factors influencing prognosis in node- negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 71:2090-100.
18. Tavassoli FA, Deville P. World Health Organization classification of tumors. *Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press; 2003.
19. United States. International Union Against Cancer. *TNM Classification of malignant tumors*. 6^a ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.
20. Genestie C, Zafrani B, Asselain B, Fourquet A, Rozan S, Validire P, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res* 1998;18(1B):571-6.
21. Brard PY. Sentinel lymph node detection and clinical applications. *Rev Med Intern* 2004; 25:383-5.

22. Lippman ME. Câncer de mama. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, editores. *Harrison medicina interna*. 14^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1998. v.1, cap.91
23. Adjuvant! Publication Intergroups Dose Dense Trial C9741. [citado 20/7/2004]. Disponível em http://www.adjuvantonline.com/news/news_c.html
24. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Adjuvant therapy for breast cancer health decision guide. [citado 20/7/2004]. Disponível em <http://www.mayoclinic.com/invoke.cfm?objectid=7D25B3E8-5C2B-49C6-96558996237CDDA7>
25. Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T, Kleiber K, Cardoso F, Lobelle J P, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A. Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-Year results from a Belgian randomized study comparing cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (cmf) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2003; 14:693-8.
26. Chaplain G, Millan C, Milan C, Sgro C, Carli P.M, Bonithon-Kopp C. Increased risk of acute leukemia after adjuvant chemotherapy for breast cancer: a population – based study. *J Clin Oncol* 2000; 18:2836-42.
27. Linassier C, Barin C, Calais G, Letortorec S, Bremond J.L, Delain M, Petit A, Georget M.T, Cartron G, Raban N, Benboubker L, Leloup R, Binet C, Lamagnere J. P, Colombat P. Early secondary acute myelogenous

- leukemia in breast cancer patients after treatment with mitoxantrone, cyclophosphamide, fluoracil and radiation therapy. *Ann Oncol* 2000; 11:1289-94.
28. Briasoulis E, Tzouvara E, Tsiara S, Vartholomatos G, Tsekeris P, Bourantas K. Biphenotypic acute leukemia following intensive adjuvant chemotherapy for breast cancer: case report and review of the literature. *Breast J*. 2003; 9:241-5.
29. Beiguelman B. *Citogenética humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. 328p.
30. Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: LEMAR; 1999. 98p.
31. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard, HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. 6ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
32. Étienne, J. *Bioquímica Genética e Biologia Molecular*. 6ª. Edição. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2003.
33. Avers CJ. *Molecular cell biology*. California: Benjamin/Cummings; 1985. 812p.
34. Trent RJ. *Introdução à medicina molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. 177p.
35. Pinho M. Câncer colo-retal com instabilidade de microssatélites: uma doença diferente. *Rev Bras Coloproctol* 2002; 22:139-44.

36. Abe Y, Masuda H, Okubo R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal cancers. *Oncol Rep* 2001; 8:299-304.
37. Chung DC, Rustgi AK. The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003; 138:560-70.
38. Passarge E. *Genética Texto e Atlas*. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. 68p.
39. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291:1284-9.
40. Gatti R. *Ataxia telangiectasia: the genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 1998. p.275-300.
41. Ventikaraman AR. Breast cancer genes and DNA repair. *Science* 1999; 286:1100-1.
42. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:201-12
43. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-67
44. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-61.

45. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-9.
46. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336-8.
47. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 1996; 14:255-7.
48. Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimizu K, Matsubara N, Meltzer SJ. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1997; 57:2350-3.
49. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-57.

50. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338:1481-7.
51. Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113:1146-58.
52. Fitzgibbons RJ Jr, Lynch HT, Stanislav GV, Watson PA, Lanspa SJ, Marcus JN, Smyrk T, Krieglner MD, Lynch JF. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987; 206:289-95.
53. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81:214-8.
54. Cutait R, Cotti G, Garicochea B, Muraro C, Carvalho F, Leite K, Camara-Lopes LH. Instabilidade de microssatélites em portadores de câncer colorretal. *Rev. Bras Colo-Proctol* 2002; 22:8.
55. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56:4021-6.

56. Dillon EK, de Boer WB, Papadimitriou JM, Turbett GR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer* 1997; 76:156-62.
57. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SE. Widespread microsatellite instability occurs infrequently in adenocarcinoma of the gastric cardia. *Oncogene* 1996; 12:1653-62.
58. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994; 9:29-32.
59. Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ, Buller RE. Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61:4371-4.
60. Tibiletti MG, Furlan D, Tadorelli M, Facco C, Riva C, Franchi M, Cossu A, Trubia M, Taramelli R, Capella C. Microsatellite instability in endometrial cancer: relation to histological subtypes. *Gynecol Oncol* 1999; 73:247-52.
61. Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russel NH. Microsatellite Instability occurs in defined subset of patients with Acute Myeloblastic Leukemia. *Br J Haematol* 2001; 114:307-12.
62. Faulkner RD, Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russel NH. BAT 25 and BAT 26, two mononucleotide microsatellites, are not sensitive markers of microsatellite instability in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124:160-5.
63. Ollitz W, Hopfinger G, Aguiar RC, Gunsilius E, Girschikofsky M, Bodner C, Hiden K, Linkesch W, Hoefler G, Sill H. Defective DNA-mismatch repair: a

- potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplastic and leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34:243-8.
64. Worrillow LJ, Travis LB, Smith AG, Rollinson S, Smith AJ, Wild CP, Holowaty EJ, Kohler BA, Wiklund T, Pukkala E, Roman E, Morgan GJ, Allan JM. An intron splice acceptor polymorphism in hMSH2 and risk of Leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3012-20.
65. Sheikka MH, Tobal K, Liu Yin JA. High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy: related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2002; 117:359-65.
66. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57:4749-56.
67. Maneval ML, Eckert KA. Effects of oxidative and alkylating damage on microsatellite instability in nontumorigenic human cells. *Mutat Res* 2004; 546:29-38.
68. Slebos R, Oh D, Umbach J, Taylor J. Mutations in tetranucleotide repeats following DNA damage depend on repeat sequence and carcinogenic agent. *Cancer Res* 2002; 62: 6052-60

69. Zienolddiny S, Ryberg D, Haugen A. Induction of microsatellite mutation by oxidative agents in human lung cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2000; 21:1521-6.
70. Chabnes BA, Allegra CJ, Curti GA, Calabresi P. Agentes antineoplásicos. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 1996. p.909-13.
71. Hardman JG, Limbird LE, editores. *Goodamn & Gilman as bases farmacologicas da terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana; 1996. p.900-1.
72. Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, Burke MM, Sullivan D, Macpherson P, Karran P. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplation. *Blood* 2004; 104:822-8.
73. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 1995; 82:321-30.
74. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994; 54:4308-12.
75. Dolan ME, Moschel RC, Pegg AE. Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a

- means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5368-72.
76. Duckett DR, Drummond JT, Murchie AI, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, Modrich P. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6443-7.
77. Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 330:1136-42.
78. Drummond JT, Genschel J, Wolf E, Modrich P. DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutS α /hMutS β ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10144-9.
79. Humbert O, Fiumicino S, Aquilina G, Branch P, Oda S, Zijno A, Karran P, Bignami M. Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis* 1999; 20:205-14.
80. de las Alas MM, Aebi S, Fink D, Howell SB, Los G. Loss of DNA mismatch repair: effects on the rate of mutation to drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1537-41.
81. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R, Howell SB. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996; 56:3087-90.

82. Fritzell JA, Narayanan L, Baker SM, Bronner CE, Andrew SE, Prolla TA, Bradley A, Jirik FR, Liskay RM, Glazer PM. Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation. *Cancer Res* 1997; 57:5143-7.
83. DeWeese TL, Shipman JM, Larrier NA, Buckley NM, Kidd LR, Groopman JD, Cutler RG, te Riele H, Nelson WG. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11915-20.
84. Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:451-9.
85. Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1985; 32:115-54.
86. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; 35:95-125.
87. Risinger JI, Barret JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer* 1996 77:1836-43.
88. Muller A, Edmonston TB, Corao DA, Rose DG, Palazzo JP, Becker H, Fry RD, Rueschoff J, Fishel R. Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1014-9.

89. Regitinig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Plomer F, Papadi H, Tsybrovsky O, Lox SF. Microsatellite analysis of breast cancer and corresponding local recurrences. *J Pathol* 2002; 198:190-7.
90. Jonsson M, Johannsson O, Borg A. Infrequent occurrence of microsatellite instability in sporadic and familial breast cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A:2330-4.
91. Iwase H, Iwata H, Toyama T, Hara Y, Omoto Y, Ando Y, Nakamura T, Kobayashi S. The Clinical value of Microsatellite Instability and a Loss in Heterozygosity in sporadic breast cancers. *Breast Cancer* 1997; 4:234-8.
92. Caldes T, Perez-Segura P, Tosar A, De La Hoya M, Diaz-Rubio E. Low frequency of microsatélite instability in sporadic breast cancer. *Int J Oncol* 2000; 16:1235-42.
93. Patel U, Grundfest-Broniatowski S, Gupta M, Banerjee S. Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumours. *Oncogene* 1994; 9:3695-700.
94. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research. *Lancet Oncol* 2001; 2:698-704.
95. Siah SP, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RL, Suthers G, Rudzki Z. Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at 'BAT 25' and 'BAT 26' microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 60:135-42.

96. Schwarzenbach H, Muller V, Stahman N, Pantel K. Detection and Characterization of circulating microsatellite: DNA in blood of patients with breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022:25-32
97. Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E. Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clinical Cancer Res* 1999; 5:839-44.
98. Siah S-P and Quinn D. M.: Microsatellite markers in breast cancer. [citado 13/7/2004]. Disponível em: <http://prmserv1/microsatellite-markers/>
99. Fumarga WB, Ryan JL, Coleman WB, Cole SR, Tsongalis GT. Alu profiling of primary and metastatic nonsmall cell lung cancer. *Exp Mol Pathol* 2003; 74:224-99.
100. Debniak T, Gorski B, Cybulski C, Jakubowska A, Kurzawski G, Kladny J, Lubinski J. Comparision of Alu-PCR, microsatellite instability, and immunohistochemical analyses in finding features characteristics for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:565-9
101. Stenger JE, Lobavech KS, Gordenin D, Darden TA, Kurka J, Resnick MA. Biased distribution of inverted and direct Alus in the human genome, implications for insertion, exclusion, and genome stability. *Genome Res* 2001; 11:12-27.
102. Murthy SK, Di Francesco LM, Ogilvie RT, Demetrick DJ. Loss of Heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15:1241-50.

103. Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Noviello C, Saieva C, Russo A, Corsi AM, Masala G, Paglierani M, Vezzosi V, Bianchi S, Mariani-Constantini R. Instability at dinucleotide and trinucleotide repeats in breast cancer. *Int J Oncol* 2000; 17:819-26.
104. Glebov OK, McKenzie KE, White CA, Sukumar S. Frequent P53 gene mutations and novell alleles in familial breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54:3703-9.

8 ANEXOS

Anexo 1

“Pesquisa de instabilidade gênica por quimioterapia antineoplásica nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres com câncer de mama”

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pretendemos através deste estudo avaliar a presença no seu sangue de duas substâncias que poderão nos ajudar a prever como a sua doença irá evoluir. O nome destas substâncias é PCNA (antígeno de proliferação celular) e também a CK-19. Além disso, mediremos também se há uma característica possivelmente produzida pelos efeitos da quimioterapia a que você vai ser submetida que é a instabilidade de microssatélites.

Este estudo será conduzido no setor de quimioterapia da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina do ABC e consistirá apenas de coletas de sangue efetuadas antes de seu tratamento, e após de 3, 6 e 9 meses. (aproximadamente 3 amostras com 5.0 mL)

Você não terá nenhum custo ou risco além das coletas de sangue, se você concordar em participar deste estudo. Como não sabemos se o achado destas substâncias no seu sangue tem ou não alguma importância, seu tratamento será o mesmo das demais pacientes com as suas características tratadas em nosso setor de quimioterapia.

Caso você não concorde em participar deste estudo você será tratada da mesma maneira sem nenhuma mudança. Sinta-se, portanto, à vontade de recusar sua participação neste estudo caso você não queira ser nele incluída. Da mesma forma, se você concordar em participar, você poderá sair do estudo a qualquer momento sem prejuízo da continuidade de seu tratamento. Os membros da equipe de pesquisa e responsáveis pelo estudo, abaixo elencados, estarão à sua disposição para quaisquer dúvidas ou esclarecimentos.

Se você concordar em participar, preencha e assine o formulário abaixo:

Eu, _____ RG: _____

Concordo em participar do estudo acima e, para tal, concordo em deixar que colem meu sangue hoje e nos intervalos da quimioterapia conforme explicado acima.

Assinatura do Paciente

Nome por extenso

Testemunha (se analfabeto)

Assinatura da testemunha

Dr. Auro Del Giglio
(Investigador Principal)
Tel.: 4993-5491

Fernando L. A. Fonseca
Responsável pela Pesquisa
Tel.: 4993-5488

Anexo 2

Tabela 1 - Resultados Gerais das Análises Laboratoriais das Pacientes

Paciente	Amostra	Alu	PCR15.1	BAT40	MFD41	BAT26	MFD28
FKN	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	7	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
TL	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	7	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
EM	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	7	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
ZL	1	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
CA	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

continua

Tabela 1 - Resultados Gerais das Análises Laboratoriais das Pacientes (continuação)

Paciente	Amostra	Alu	PCR15.1	BAT40	MFD41	BAT26	MFD28
MBD	1	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
	7	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
MDS	1	negativo	negativo				
IMMP	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
DCS *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
AMPC *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
MSN *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

continua

Tabela 1 - Resultados Gerais das Análises Laboratoriais das Pacientes
(continuação)

Paciente	Amostra	Alu	PCR15.1	BAT40	MFD41	BAT26	MFD28
IGI	1	negativo	negativo				
MGT	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
LCS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
**	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
SBS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
LNTR	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
SCG	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
MJS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
JMSR *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

continua

Tabela 1 - Resultados Gerais das Análises Laboratoriais das Pacientes
(continuação)

Paciente	Amostra	Alu	PCR15.1	BAT40	MFD41	BAT26	MFD28
EBS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
NÃO *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
MSM *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
CMFBS *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
EMO *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo
CKA	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
BMS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
VLA *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
AMM *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	3	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
MLS	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

continua

Tabela 1 - Resultados Gerais das Análises Laboratoriais das Pacientes
(continuação)

Paciente	Amostra	Alu	PCR15.1	BAT40	MFD41	BAT26	MFD28
GF	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
TCDA	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
MAP *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
MLF *	1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Anexo 3

“Pesquisa de instabilidade gênica induzida por quimioterapia antineoplásica nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres com câncer de mama”

Questionário para doadoras de sangue (Controle Externo)

Como a senhora sabe, seu sangue está sendo coletado para servir como controle em uma pesquisa com o sangue de mulheres com câncer de mama. Isso quer dizer o seu sangue é estudado como sendo o sangue de uma pessoa saudável e que serve como “exemplo” de como é o resultado dos testes que realizamos quando o sangue não apresenta qualquer alteração. Isto serve para podermos reconhecer e explicar algumas alterações no sangue de pessoas com câncer de mama.

As perguntas que faremos são apenas para assegurar que o seu sangue servirá como melhor “exemplo” para os testes que realizaremos. Responder SIM a qualquer das perguntas não significa que a senhora tem câncer, ou qualquer doença que predisponha ao câncer e nem que o seu sangue não servirá para a pesquisa.

I) História Pessoal

	SIM	NÃO	Especifique
Você alguma vez, teve algum diagnóstico de Câncer?			
Você tem ou teve algum problema de Saúde que seja ou tenha sido suspeitado como sendo câncer?			
Você apresenta, ou já apresentou algum sangramento intestinal ou vômito com sangue?			
Você apresenta, ou já apresentou alguma ferida, úlcera, ou tumor no colo de útero?			
Você apresenta ou já apresentou alguma alteração no exame de papanicolau que tenha indicado a necessidade de biópsia?			
Você apresenta ou já apresentou tosse com sangue ou nódulos pulmonares vistos no RX de tórax?			
Você apresenta ou já apresentou tosse com sangue ou nódulos pulmonares vistos no RX de tórax?			

II) História Familiar

	SIM	NÃO	Especifique
Algum familiar (pais, irmãos ou filhos) que tenham tido algum diagnóstico de Câncer ?			
Alguém na família com diagnóstico de câncer antes dos 40 anos de idade?			
Alguém na família com câncer de mama, ovário ou intestino?			
Alguém na família com sarcoma ou câncer nos ossos ou músculos?			