JORGE LUIZ FREIRE PINTO

**DNA plasmático e urinário em pacientes com câncer de
mama - possibilidade de um novo marcador de instabilidade
genética tumoral induzida por quimioterapia**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos
e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Auro Del Giglio

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Jorge Luiz Freire

DNA plasmático e urinário em pacientes com câncer de mama – possibilidade de um novo marcador de instabilidade genética tumoral induzida por quimioterapia / Jorge Luiz Freire Pinto. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Auro Del Giglio.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Marcadores biológicos de tumor
3.Instabilidade de microssatélites 4.Quimioterapia 5.Antineoplásicos alquilantes
6.Segunda neoplasia primária

USP/FM/SBD-339/09

EPÍGRAFE

“Vós que sois a verdadeira fonte da luz e o princípio supremo da sabedoria, difundi sobre as trevas da minha mente o raio do esplendor, removendo as duplas trevas nas quais nasci: o pecado e a ignorância.”

São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor inconcebível, por não se cansar de nos maravilhar com a sua obra e por ter me oferecido graciosamente a dádiva de observar sua criação de um ângulo microscópico, porém não menos admirável.

À minha amada esposa Lígia, luz de minha vida e graça divina em meu caminhar, por seu companheirismo, resignação e toda a ajuda na realização de nossos sonhos, o mais sincero agradecimento por todo o amor e exemplo de competência e organização.

Aos meus veneráveis pais, Lunder e Graça por todo o empenho, caráter, amor e copiosa caridade cristã em minha educação acadêmica, moral e religiosa três tesouros que nunca me serão roubados.

À minha irmã Tatiana por seu apoio em todos os momentos vividos neste trabalho por sua preocupação constante com a realização deste projeto.

Aos meus cunhados Alexandre, Ramiro, Beatriz, Ana Lúcia e Wagner por toda a amizade e apoio a mim dedicados.

À minha avó Maria da Graça por todo exemplo de perseverança na vida apesar de todas as dificuldades, pelo carinho e atenção constantes nestes últimos tempos.

Às minhas sobrinhas Maria Eduarda e Paula que mesmo ainda pequeninas iluminam de maneira gigantesca minha vida.

Aos meus sogros Mauro e Marisa por todos os todo o auxílio prestado no curso deste trabalho e pela prontidão em estarem sempre à disposição.

A meus avós Geraldo, Maria de Lourdes e Joaquim que da glória de Deus observam a realização deste trabalho, sem nunca estarem ausentes.

Aos avós de minha esposa Jorge, Lúcia e Linda por todo o carinho e atenção dispensados a minha pessoa e todo o exemplo de vida que carregam em si.

Ao meu orientador Professor Doutor Auro del Giglio, por toda a atenção dispensada em minha formação, por seu notório carinho ao ensinar, enfim pelo médico, professor e religioso exemplar.

Ao professor Doutor Irineu Tadeu Velasco coordenador responsável pelo programa de pós graduação do departamento de ciências médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade dada, meus agradecimentos.

Às secretárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Terezinha, Rose e Angélica por todo o auxílio recebido para a resolução dos processos envolvidos neste trabalho.

Ao meu amigo Cezar Gustavo, por partilhar seu ouvido amigo, sua paciência e toda a amizade nas horas em que tanto ouviu sobre este trabalho.

Ao meu amigo Fernando Luiz Affonso Fonseca, por toda ajuda no desenvolvimento técnico deste trabalho e por todos os conselhos e zelo com que realiza todos os projetos em que se envolve, tal zelo me serve de inspiração.

À minha amiga farmacêutica Fernanda Schindler que tanto me ajudou, nas muitas vezes em que tive de sair de meu trabalho para as mais diversas tarefas que este projeto me requisitou, deixo impresso minha sincera gratidão.

Ao Dr Shigero Harada, meus agradecimentos pela compreensão e apoio dado para a realização deste trabalho.

À Pâmela, Patrícia, Renata, Sarah e Viviane que tanto colaboraram na realização deste trabalho pelos muitos momentos que entre uma coleta e outra que partilhamos e por toda a ajuda nestes momentos.

Aos meus amigos do laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina do ABC, Aleksandra, Ana Paula, Cláudia, Vivia, Thaís, Leuda, Luciana, Gabriela, Roseli e Simone por todo o apoio prestado para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas da Disciplina de Bioquímica Eloah, Therésè, Carolina e Sabrina por todas as nossas conversas e apuros passados juntos.

Às equipes de enfermagem dos Hospitais Mário Covas, Anchieta e da Faculdade de Medicina do ABC pela ajuda na coleta das amostras das pacientes deste trabalho.

À estimada Professora Doutora Lucila Heloisa Simardi Santiago por todo o carinho respeito e amor demonstrados a minha pessoa todos estes anos, por sua competência e caráter notável.

À professora Doutora Maria Aparecida Silva Pinhal por todas as orientações dirigidas a este trabalho em meu exame de qualificação.

À Professora Doutora Ligia Ajaime Azallis por toda a ajuda na observação e nos precisos conselhos sobre a organização do trabalho em meu exame de qualificação.

Ao saudoso e inestimável Professor Doutor Mário Motidome que tanto me ensinou sobre a vida acadêmica. Sempre lhe serei grato por seus ensinamentos e que com a realização deste trabalho possa cumprir sua última orientação “Gambatê! Gambatê”.

A meus amigos Ailton, Francisco, Péricles, Leandro e Júlio pela amizade mesmo entre um golpe e outro da vida, ainda que por vezes distante.

Ao meu venerável amigo Pe. Flávio de Alcantra, por todas as nossas discussões e sincera amizade e por uma resposta “mais isso você resolve fácil!” quando o assunto era o presente trabalho.

Aline, Luis Otávio, Renata, Graziela, Danielle, Vanessa, Ana Caroline, Thelma e Carolina, meus colegas de graduação que sempre me estimularam e acreditaram em meu potencial para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da universidade paulista, Enny Fernandes Silva, Alípio Carmo, Paula Knox, Alessandra Xavier, Luana Cardoso, Margarida, Mercedes Toledo, Luciana Auad , Eduardo Tarvesa e Luis Barone pelo companheirismo fundamental a realização deste trabalho.

Aos meus estimados estagiários Allan, Jéssica e Rafael por toda a ajuda nas horas em que tive de me ausentar por causa deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer de mama	1
1.2	Fatores de risco para o câncer de mama	2
1.3	Carcinogênese mamária.....	3
1.4	Regiões de microssatélites.....	8
1.4.1	Instabilidade de microssatélites e HNPCC Erro! Indicador não definido.10	
1.4.2	Instabilidade de microssatélites em neoplasia mamária.....	11
1.4.3	Instabilidade de microssatélites em células sangüíneas de pacientes portadoras de carcinoma mamário.	12
1.5	Avaliações adicionais da instabilidade genômica	16
1.5.1	DNA plasmático livre em tumores sólidos	16
1.5.2	DNA do sedimento urinário.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	20
3.1	Pacientes	20

3.2	Extração de DNA da fração mononuclear do sangue periférico	21
3.3	Extração de DNA plasmático.....	22
3.4	Extração de DNA urinário	23
3.5	Amplificação dos microsatélites	24
3.6	Determinação de CEA e CA15. 3Erro! Indicador não definido.	27
3.7	Análise estatística.....	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Descrição das pacientes.....	28
4.2	Análise da instabilidade genômica por tipo de tratamento.....	37
4.2.1	Tratamento Adjuvante	38
4.2.2	Tratamento Neoadjuvante	38
4.2.3	Tratamento Paliativo.....	40
4.3	Avaliação do DNA plasmático	40
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS.....	59
8	ANEXOS	67
	Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	67
	Anexo 2 - Tabela de avaliação dos dados clínicos.....	70
	Anexo 3 - Tabela de avaliação dos dados moleculares	71

RESUMO

DNA Plasmático e Urinário em paciente com câncer de mama - possibilidade de um novo marcador de instabilidade genética tumoral induzida por quimioterapia [tese]. São Paulo: Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

O câncer de mama é a neoplasia com maior mortalidade entre as mulheres. O emprego de agentes alquilantes no tratamento desta neoplasia pode ocasionar o surgimento de instabilidades genômicas. Tais instabilidades podem estar associadas ao desenvolvimento de neoplasias secundárias como, por exemplo, leucemias. A presente tese avaliou a instabilidade de microssatélites em amostras de sangue, sedimento urinário e plasma de pacientes portadoras de carcinoma mamário ao diagnóstico, 3 e 6 meses após o início do tratamento quimioterápico. Também foi avaliada a concentração do DNA plasmático livre como possível marcador tumoral junto aos marcadores séricos CEA e CA15.3, empregados no acompanhamento do câncer de mama. Foram avaliadas as regiões de microssatélites: Tp53-ALU, Tp53.PCR15.1, BAT 40, BAT26, FMR2 e APC. Entre as 40 pacientes incluídas no presente estudo 88,57% apresentaram instabilidade de microssatélites na fração mononuclear do sangue periférico, 85,8% nas amostras de sedimento urinário e 62,5% no DNA plasmático livre. Não houve concordância significativa entre as instabilidades encontradas nos três tipos de amostra. A concentração de DNA plasmático livre das pacientes quando comparada às doadoras sadias apresentou correlação estatisticamente significativa ($p > 0,0001$), e em paciente em regimes neoadjuvantes que responderam objetivamente à quimioterapia ($p = 0,02$) e não houve correlação com os marcadores séricos CEA e CA15.3.

SUMMARY

Plasmatic and Urinary DNA in patients with breast cancer - possibility of a new tumoral genomic instability marker induced by chemotherapy [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (Brazil), 2009.

Breast cancer has the major mortality in women among all kind of cancer. The use of alkylating agents at the treatment of this disease is associated with genomic instability. This instability could be associated with the development of secondary cancer, for example, leukemia. The present thesis evaluated microsatellite instability in blood, pellet cells urinary and plasma in patients with breast cancer at diagnosis, 3 and 6 months after the beginning of chemotherapy. There were evaluated also Free Plasmatic DNA concentration as a possible tumoral marker with the serum markers CEA and CA15.3 used in breast cancer follow up. The microsatellites regions assayed were: Tp53-ALU, Tp53.PCR15.1, BAT 40, BAT26, FMR2 e APC.

Among the 40 patients included at the present study 88,57% showed microsatellite instability in peripheral mononuclear blood cells, 85,8% in urinary pellet cells samples and 62,5% in Free Plasmatic DNA. There weren't statistical significant relationship for the instability found at the three kind of samples assayed. The Free Plasmatic DNA concentration of the patients when compared with healthy donors, showed a statistical significant relationship ($p < 0,0001$). And among patients in neoadjuvant chemotherapy regime who reacted positively by treatment ($p = 0,02$). And there weren't statistical significant relationship between Free Plasmatic DNA and serum markers CEA and CA15.3.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
AML(LMA)	Leucemia mielóide aguda
ATP	Adenosina trifosfato
CA 15.3	Antígeno Carboidrato 15.3
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Diamino Triacético
EGFR	Fator de crescimento epidermal
Erb-b2	Receptor do fator de crescimento epidérmico
G	Gravidade
HNPCC	Cancer colo-retal hereditário sem polipose
IGFs	Fatores de crescimento similares à insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOH	Perda de heterozigosidade
MDR-1	Gene de resistências a múltiplas drogas
mL	Mililitro
μL	Microlitro
MMR	Sistema de reparo do mau pareamento do DNA
MSI	Instabilidade de Microsatélites
MSI	Instabilidade de microsatélites
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de base
PCR	Reação da Polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF α	Fator transformante de crescimento α
TGF β	Fator transformante de crescimento β

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos fragmentos das regiões de microssatélites que serão analisadas.....20

Tabela 2 – Concordâncias encontradas entre as amostras de sangue e urina.24

Tabela 3 – Concentração de DNA plasmático livre em doadoras sadias, determinado por espectrofotometria.....33

Tabela 4 – Concentração de DNA plasmático livre nas pacientes ao diagnóstico.....34

Tabela 5 – Concentrações de DNA plasmático em comparação com pacientes controles Teste *t*-Student para amostras independentes.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de diferenciação celular de células progenitoras em células mioepiteliais na presença e na ausência da proteína BRCA1.....	5
Figura 2: Via mitocondrial intrínseca da apoptose.....	10
Figura 3 - porcentagem de eventos (instabilidade de microssatélites ou LOH) nos marcadores analisados.....	24
Figura 4 – Porcentagem de pacientes com instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue periférico.....	25
Figura 5 – Porcentagem de eventos(instabilidade de microssatélites ou LOH) nos marcadores analisados na urina.....	26
Figura 6 – Porcentagem de pacientes com instabilidade genômica na urina.....	26
Figura 7 – Porcentagem de acometimento das diferentes regiões de microssatélites no DNA plasmático.....	27
Figura 8 – Porcentagem de pacientes com acometimento das diferentes regiões de microssatélites estudadas no DNA plasmático.....	28
Figura 9 – Porcentagem de concordância entre as matrizes analisadas.....	29
Figura 10 – Distribuição dos marcadores de microssatélites concordantes.....	30
Figura 11 – Distribuição do número de instabilidades nas diferentes regiões de microssatélites estudadas nos pacientes em neoadjuvância.....	31

Figura 12 - Curva ROC avaliando a concentração do DNA plasmático de pacientes ao diagnóstico quando comparadas às doadoras.....35

Figura 13 - Curva ROC avaliando a concentração do DNA plasmático de pacientes com tumores localizados em comparação aos metastáticos.....36

Figura 14 - Géis de poliacrilamida referentes às amostras de sangue, urina e plasma para a região microssatélite TP-53 PCR15.1, de uma paciente em tratamento neoadjuvante. Ao lado representação gráfica dos marcadores CEA e CA 15.3 e a concentração de DNA plasmático livre.....37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia de maior mortalidade entre as mulheres tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. Segundo levantamento realizado pelo INCA - Instituto Nacional do Câncer - no ano 2003, essa neoplasia foi responsável por 9335 óbitos. A incidência desse câncer no Brasil, no ano de 2008, foi de 49.400 casos, pouco mais de 20% de todos os cânceres diagnosticados em mulheres, e 10% de todas as neoplasias (www.inca.gov.br).

A neoplasia mamária apresenta a maior incidência entre as mulheres seguida pelo câncer de colo do útero (www.inca.gov.br).

O câncer de mama se apresenta incomum antes dos 35 anos, mas a partir desta faixa etária, a sua incidência cresce progressivamente (www.inca.gov.br).

Na década de 60 e 70, observou-se um aumento de dez vezes em sua incidência e segundo a *American Cancerology Society*, uma em cada dez mulheres apresenta a possibilidade de desenvolver a referida neoplasia (<http://www.cancer.org>).

1.2 Fatores de risco para o câncer de mama

Entre os fatores de risco para o câncer de mama podemos mencionar principalmente os seguintes:

- idade: cerca de 12,5% dos casos ocorrem antes dos 45 anos de idade, enquanto dois terços das pacientes possuem 55 anos ou mais ao diagnóstico da neoplasia maligna (<http://www.cancer.org>).

- mutações nos genes BRCA1 e 2: Genes que codificam proteínas que modulam o ciclo celular. Segundo a *American Cancer Society* mulheres com mutações nestes genes apresentam chances superiores a 80% de desenvolverem neoplasia mamária. O desenvolvimento do carcinoma mamário nestas pacientes ocorre mais cedo do que em pacientes sem a referida mutação (<http://www.cancer.org>).

- histórico familiar: mulheres com uma parente de primeiro grau acometida pela neoplasia mamária possuem o dobro do risco de desenvolvê-la. Quando são duas parentes de primeiro grau afetadas o risco quintuplica. Cerca de 25% das pacientes com câncer de mama possuem histórico familiar (MacMahon, 2006).

- grupo étnico: a neoplasia mamária acomete com maior incidência mulheres caucasianas, enquanto mulheres negras apresentam, por causas ainda não elucidadas, maior tendência às neoplasias mais agressivas (MacMahon, 2006).

- paridade: mulheres que apresentam múltiplas gestações são menos acometidas quando comparadas às pacientes com uma ou duas gestações (MacMahon, 2006).

- amamentação: Mulheres que amamentam por dois anos apresentam uma redução no risco do desenvolvimento da neoplasia mamária (<http://www.cancer.org>).

- exposição hormonal: mulheres com menarca mais jovens são mais susceptíveis ao desenvolvimento da neoplasia mamária. Pacientes em uso de contraceptivos e em terapia de reposição hormonal também possuem uma elevação de risco, no entanto após alguns anos do fim desses tratamentos o risco tende a normalizar (MacMahon, 2006).

- obesidade: especialmente após a menopausa, pois o tecido adiposo pode produzir estrógeno quando os ovários param de fazê-lo, aumentando assim o risco para o carcinoma mamário (<http://www.cancer.org>).

1.3 Carcinogênese mamária

O entendimento dos processos que ocorrem durante a transformação do tecido mamário normal em um carcinoma mamário permanece incompleto.

Morfologicamente é possível verificar que pacientes que possuem hiperplasia ductal atípica, estariam mais sujeitas a desenvolver carcinoma *in situ* e por fim a forma invasiva da neoplasia mamária (Singletary, 2002).

O desenvolvimento da neoplasia mamária está relacionado a alterações genéticas e epigenéticas como alterações de expressão de genes ou seu silenciamento. A ausência da função dos genes supressores de

tumor e a aceleração do ciclo celular podem levar a uma hiperplasia ductal, com o acúmulo de mutações ou ainda superexpressão de genes. A superexpressão do gene *ras* é um dos principais fatores na progressão da malignidade, mas não no seu surgimento (Singletary, 2002).

O gene supressor de tumor *Tp53*, conhecido como guardião do genoma, codifica uma proteína que não só regula o ciclo celular, mas também é capaz de levar a célula para a morte por apoptose. Apta a ligar-se ao ácido desoxirribonucléico (DNA) em situações de lesão, sinais de proliferação anômalos, erosão telomérica, hipóxia, perda de adesão ou perda de sinal de sobrevivência. Esta ligação consegue parar a transcrição de genes que aceleram o ciclo celular e ainda iniciar a transcrição de outras proteínas de reparo. Desta forma a proteína p53 é capaz de corrigir erros no genoma e ainda, se estes erros não forem passíveis de correção, impedir a propagação de células com patrimônio genético alterado através da ativação de vias apoptóticas (Singletary, 2002).

A mutação no gene *tp53* bem como a ineficiência de sua função leva a uma hiperproliferação e acúmulo de alterações genômicas contribuindo para a tumorigênese (Singletary, 2002; Fonseca *et al.*, 2004).

Já foram descritas ainda associações das mutações do TP-53 como um fator de retroalimentação negativo para a trombospondina que possui uma atividade anti-angiogênica *in vivo*, e com a expressão do gene de resistência a múltiplas drogas chamado *MDR-1* (Devita *et al.*, 1993; Singletary, 2002).

Morfologicamente é possível verificar a mutação no TP-53 em tumores benignos e em fibroadenomas com aumento de proliferação epitelial (Singletary, 2002).

Adicionalmente os fatores de crescimento, apresentam papel importante na alteração do crescimento celular na carcinogênese mamária. A família dos receptores para fatores de crescimento como o EGFR (*epidermal growth factor receptor*), pode estar superexpressa como, por exemplo, o C-erb-B2 (Singletary, 2002).

O Erb-b2 é uma proteína transmembrana com função tirosina quinase que se liga a fatores de crescimento desencadeando uma série de reações que levam ao crescimento celular (Browne *et al.*,2009).

O aumento de sua expressão em pacientes com carcinomas primários, ou ainda em tumores benignos com taxa de 25% pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de lesões invasivas (Fonseca *et al.*,2002; Browne *et al.*,2009).

A superexpressão de Erb-b2 não é observada em células displásicas, fato que pode servir como indicador da transformação entre a displasia e o carcinoma ductal *in situ* (Singletary ,2002; Browne *et al.*,2009).

O receptor Erb-b2 e sua sinalização já são inclusive alvos para a terapêutica oncológica, tanto o uso de anticorpos monoclonais quanto inibidores de tirosina quinase ativadas subsequentemente (Browne *et al.*, 2009).

Também merecem destaque no desenvolvimento do câncer de mama os fatores de crescimento como o TGF α (*transforming growth factor α*), e os

IGFs (*Insulin like growth factors*). Os tumores também podem ser estimulados paracrinamente pelo TGF β (*transforming growth factor β*) e o fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF. A regulação da síntese e liberação desses produtos é mediada pelo estrógeno, sendo importante no desenvolvimento dos tumores que apresentem receptores para o referido hormônio (Devita *et al.*, 1993).

O gene *brca1* e *brca2* estão envolvidos na gênese de tumores mamários em pacientes mais novas e seus tumores são geralmente basalóides, de rápido crescimento, não expressam receptores de estrógeno progesterona e Erb-B2, e alta imuno-expressão de marcadores de diferenciação mioepitelial. A hipótese de carcinogênese se baseia na desregulação do processo de auto-renovação das células pluripotentes presentes no tecido mamário (Foulkes, 2004).

Neste modelo as proteínas BRCA1 e 2 agiriam como reguladores da diferenciação das células progenitoras mamárias. Estas proteínas direcionariam o desenvolvimento das células em células mioepiteliais ou em células luminais. Em modelos *in vitro* sua importância foi observada na alteração de células progenitoras de células luminais, que não expressam receptores de estrógeno, em células que às expressam. A mutação do BRCA 1 simulada pela sua ausência de expressão levou a acúmulo de células que não possuíam receptores de estrógeno (Liu *et al.*, 2008).

Ainda se observou em tecido mamário de pacientes portadoras de mutações no BRCA1, a presença da aldeído desidrogenase (ALDH), um marcador de células tronco indicando a não diferenciação do tecido mamário

(Figura 1). Tal achado pode corroborar para o papel do BRCA 1 na carcinogênese mamária (Liu *et al.*, 2008).

Figura 1: Modelo de diferenciação celular de células progenitoras em células mioepiteliais na presença e na ausência da proteína BRCA1 Adaptado de Liu 2008.

1.4 Regiões de microssatélites

As regiões de microssatélites são repetições tandem de número variado em cada indivíduo caracterizadas por seu tamanho de um a seis nucleotídeos: $[A]_n$ representação de uma repetição mononucleotídica, $[AT]_n$ uma repetição dinucleotídica e assim sucessivamente (Dietmaier *et al.*, 1997).

As regiões microssatélites não codificam proteína, e estão amplamente distribuídas pelos cromossomos humanos sendo portanto representativas da estabilidade genômica (Dietmaier *et al.*, 1997).

As regiões de microssatélites estão inseridas no genoma para ajudar na regulação de genes próximos às mesmas, tais genes encontram-se entre essas regiões, entre eles podemos citar: *ilgf*, *e2f-f* e *bax*, que são genes codificadores de proteínas ligadas ao crescimento e morte celular. Esses genes se apresentam mutados em tumores que apresentam instabilidade genômica caracterizada como instabilidade de microssatélites (MSI do inglês *Microsatellite Instability*) (Lawes *et al.*, 2003).

As alterações nas regiões microssatélites adjacentes aos genes supracitados poderiam gerar um desequilíbrio entre ciclo celular e apoptose característico do desenvolvimento de neoplasias (Lawes *et al.*, 2003).

Dada a natureza destas repetições, essas regiões estão mais sujeitas a erros do maquinário de replicação celular que muitas vezes não é capaz de copiá-las fielmente ocasionando erros de replicação. Esses erros são ocasionados por inserções ou deleções de nucleotídeos nessas regiões, acarretando a instabilidade de microssatélites. Para prevenir a perpetuação

destes erros existe um complexo sistema de reparo genômico conhecido como genes de reparo do DNA (*mismatch repair system-MMR*). Esse sistema enzimático possui a função de verificar a fidelidade da fita de DNA recém-sintetizada com a fita mãe (Dietmaier *et al.*, 1997).

O reparo do mau pareamento envolve complexos protéicos que possuem homologia com os complexos MutS e Mut L encontrados na bactéria *Escherichia coli*. Nos seres humanos esses complexos são compostos por heterodímeros. No complexo MutS podemos mencionar as proteínas MSH2, MSH3 e MSH6. Suas funções podem ser distintas pelos erros que corrigem, o complexo MutS α formado por MSH2 e MSH 6 reconhece inserções de apenas uma base nitrogenada, enquanto os erros maiores de duas a seis bases nitrogenadas são reconhecidos pelo complexo MutS β composto por MSH2-MSH3 (Buermeyer *et al.*,2001).

Para a excisão do erro é necessário que o complexo MutS interaja com o complexo MutL. Este complexo tem função ATPásica e está ligado a excisão do fragmento que possui o erro e a ressíntese desta região. Os heterodímeros descritos do complexo MuL são: Mut α MLH1 e PMS2, MutL β MLH1 e PMS1 e MutL γ MLH1 e MLH3. Os heterodímeros MutS e MutL α interagem entre si, bem como os complexos MutS e MutL β . Foi verificado que o complexo MutL γ está implicado no *crossing over* ocorrido durante a meiose das células (Kondo, 2001; Buermeyer *et al.*,2001).

Tal sistema corrige os erros encontrados na fita através de sua atividade exonucleásica, e prossegue com o ciclo celular. Em situações em que os erros encontrados não são corrigíveis o sistema de reparo aciona via

p53 uma série de reações em cascata de sinais celulares que levarão a morte celular por apoptose. Em situações em que a expressão dos genes de reparo do DNA está diminuída ou silenciada, as células passam a acumular erros de replicação o que permitiria o acúmulo de mutações (Lawes *et al.*,2003; Dietmaier *et al.*, 1997; Young *et al.*,2003).

1.4.1 Instabilidade de microssatélites e HNPCC

A instabilidade de microssatélites foi estudada primeiramente em casos de câncer de colo retal hereditário não-polipose do inglês HNPCC (*hereditary non polyposis colonrectal cancer*). A importância da instabilidade destas regiões genômicas está intimamente ligada a carcinogênese e a mutações de diferentes genes de reparo do DNA. Em outros tipos de tumores a instabilidade de microssatélites aparece em menor porcentagem dos casos (Aaltonen *et al.*,1993; Anbazhagan *et al.*,1999 ; Ionov *et al.*,1993; Lawes *et al.*,2003 ; Thibodeau *et al.*,1993).

1.4.2 Instabilidade de microssatélites em neoplasia mamária

A incidência de instabilidades de microssatélites apresenta uma grande variação na literatura de 3 a 30% (Halford *et al.*, 2003; Anbazhagan *et al.*, 1999; Benachenhoun *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 1998). As discrepâncias encontradas podem ser explicadas por diferenças nas análises bem como o número de regiões avaliadas, a natureza das repetições dos microssatélites analisados. Além de características clínicas distintas entre as pacientes incluídas nestes estudos entre algumas características pode-se mencionar a idade das pacientes e a natureza uni ou bilateral da neoplasia mamária. (Fujii *et al.*, 1998; Iwase *et al.*, 1997). Paulson e Wild observaram um pior prognóstico em pacientes que possuíam instabilidade de microssatélites (Paulson *et al.*, 1996; Wild *et al.*, 2004).

Fu e colaboradores descreveram que a instabilidades de microssatélite no braço curto do cromossomo 3, ainda que em lesões pré-cancerosas possui grande importância no desenvolvimento do tumor mamário e se correlaciona com pouca diferenciação do carcinoma mamário (Fu *et al.*, 2007).

A instabilidade de microssatélites foi observada como possível marcador de progressão em carcinomas invasores, correlacionando se ainda com idade, metástases, grau histológico e tamanho do tumor (Kim *et al.*, 2004; Pizzi *et al.*, 2002).

Pizzi e colaboradores demonstram uma diminuição da expressão da proteína P53 nos tumores que apresentavam instabilidade de microssatélites. No mesmo estudo se observou a troca da população celular

que expressava a P53 pela que possuía instabilidade de microssatélites. A instabilidade se correlacionou ainda com estágios avançados da doença (Pizzi *et al.*, 2002).

1.4.3 Instabilidade de microssatélites em células sangüíneas de pacientes portadoras de carcinoma mamário.

O tecido sanguíneo não está envolvido diretamente com a tumorigênese mamária. Contudo, certos tipos de tratamento incluindo agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, podem induzir em células normais instabilidade genômica nas regiões de microssatélites. Fonseca e colaboradores demonstraram uma incidência maior do fenômeno em pacientes que fizeram uso de regimes contendo agentes alquilantes frente a pacientes que não empregaram tais agentes em seu tratamento (Fonseca *et al.*, 2005).

Corroborando com o dado supracitado observou-se que em pacientes com instabilidade de microssatélites a expressão da proteína de reparo hMSH2 estava diminuída (Fonseca *et al.*, 2005).

Um modelo *in vitro* na linhagem celular MCF-7 foi criado para averiguar a redução da expressão da proteína de reparo hMSH2 apresentando instabilidade de microssatélites, confirma os dados observados em pacientes (Marsicano *et al.*, 2008).

As lesões ao DNA geradas por agentes alquilantes como os monoadductos são identificadas pelo sistema de reparo genômico que via P53 encaminha as células para apoptose, via intrínseca (figura 2) (Jin, 2005).

Em células com expressão deficiente das proteínas de reparo não há acionamento da P53 acumulando alterações genômicas. Uma das principais hipóteses para essa diminuição na expressão das moléculas de reparo é a metilação do promotor dos genes que codificam tais proteínas (Li *et al.*, 2002).

Tal fenômeno epigenético já foi observado no HNPCC. Strazzullo e colaboradores observaram ausência de metilação do gene hMLH1 em pacientes com expressão normal, enquanto 23% das amostras com deficiência de expressão apresentavam o promotor do referido gene metilado (Strazzullo *et al.*, 2003).

Figura 2: Via mitocondrial intrínseca da apoptose (Jin, 2005). Frente à lesão genômica encontrada, a P53 ativa a transcrição do complexo noxa/puma que irá inibir as proteínas de manutenção da permeabilidade da membrana mitocondrial (Bcl) e ainda ativar a transcrição do gene bax desencadeando o extravasamento do material mitocondrial que ativará a via das caspases.

Além da classe dos agentes alquilantes outras drogas antineoplásicas empregadas no tratamento do carcinoma mamário como as antraciclinas e os inibidores de topoisomerase foram implicados no aumento do risco para leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásica após tratamento (Le Deley *et al.*, 2007).

Esta instabilidade genética induzida pelo tratamento em tecidos não comprometidos com o tumor primário poderia explicar a incidência de leucemias agudas e ou mielodisplasias secundárias que acometem cerca de 5% das pacientes com carcinoma mamário após o tratamento quimioterápico (Casorelli *et al.*,2003; Leoni *et al.*,1999; Bernard-Marty *et al.*,2003).

A instabilidade encontrada nas células sanguíneas poderia ocorrer também no tumor, fato que acarretaria na quimioresistência do tumor frente às drogas alquilantes (Bernard-Marty *et al.*,2003).

As proteínas de reparo podem encaminhar as células, inclusive as tumorais, para apoptose, com a redução da expressão destes genes , a ligação do fármaco ao DNA permaneceria sem que a célula fosse encaminhada para a morte. Watanabe e colaboradores demonstraram que depósitos tumorais extirpados de pacientes com carcinoma ovariano resistentes a tratamento com cisplatina tinham instabilidade de microssatélites e redução do gene hMLH1, mesmo em casos nos quais os tumores primários não exibiam este achado antes do tratamento quimioterápico (Watanabe *et al.*,2001).

1.5 Avaliações adicionais da instabilidade genômica

1.5.1 DNA plasmático livre em tumores sólidos

A presença de ácidos nucleicos livres na circulação é descrita desde a década de 70 (Leon *et al.*,1977), contudo sua associação com doenças de origem neoplásica foi atestada no final da década de 1980 (Stroun *et al.*,1989).

A origem do DNA livre na circulação não foi totalmente elucidada, porém acredita-se que estes ácidos nucleicos sejam oriundos de células tumorais que sofreram necrose. Tal processo permitira que as moléculas de DNA permaneçam integras na circulação, diferentemente do DNA condensado encontrado em células apoptóticas (Ziegler *et al.*,2002, Wang *et al.*,2003).

Em pacientes saudáveis, o DNA plasmático livre possivelmente é o DNA oriundo da apoptose das células, condensado e de pequeno comprimento, já em pacientes portadoras de neoplasia esta amostra seria enriquecida por DNA necrótico, de autólise ou ainda de catástrofe mitótica, processos de morte encontrados nas neoplasias e que liberam DNA mais integro (Umetani *et al.*, 2006).

O DNA plasmático livre poderia então fornecer informações sobre a condição genômica do tumor primário (Johnson, 2002; Silva *et al.*,1999), estas informações seriam úteis na avaliação genética dos tumores primários, pois fenômenos como a instabilidade de microssatélites estão associados a

um pior prognóstico e a resistência aos agentes quimioterápicos (Watanabe *et al.*,2001).

É importante também ressaltar que a concentração desses ácidos nucléicos na circulação está associada ao pior prognóstico. Sozzi e colaboradores avaliaram em pacientes portadores de melanoma e câncer de pulmão, a concentração de DNA plasmático livre e a instabilidade de microssatélites e observou pior prognóstico em pacientes com elevação na concentração da molécula na circulação (Sozzi *et al.*,2001,Taback *et al.*,2001).

Em tumores mamários Umetani e colaboradores avaliaram por meio da região de microssatélite ALU, a integridade do DNA plasmático, como biomarcador para progressão da doença e metástase linfonodal. Desta forma é possível distinguir o DNA apoptótico do necrótico, sendo o último um marcador potencial para a detecção do DNA neoplásico no sangue (Umetani *et al.*,2006).

1.5.2 DNA do sedimento urinário

A amostra do sedimento urinário, matriz de fácil acesso, cujo emprego ainda se faz necessário avaliar. Possuiria esta amostra o mesmo perfil de instabilidade genética do sangue sendo, portanto uma alternativa ainda menos invasiva. Em trabalhos prévios já foram observados na urina componentes de lesão do estresse oxidativo do DNA por metabólitos do tabaco (Gackowski *et al.*,2003).

A concentração do DNA urinário foi empregada como marcador de morte celular e de nefrotoxicidade. Em modelos experimentais, camundongos expostos à gentamicina, observa-se uma elevação na concentração de DNA da urina (Lulé *et al.*,1990).

Li e colaboradores observam ainda que o aumento da excreção de ácidos nucléicos pela urina pode estar relacionada à reação de rejeição do enxerto em pacientes que foram submetidos a transplantes renais (Li *et al.*,2005).

Botezatu, em um modelo animal, observou que os ácidos nucléicos liberados no plasma atravessam a barreira renal e chegam à urina. Foi avaliada por meio da seqüência ALU humana, e que o DNA polimérico foi excretado na ordem de 0,06% em até três dias (Botezatu *et al.*,2000). Em humanos, foi possível detectar seqüências do cromossomo Y em mulheres que receberam sangue de homens (Botezatu *et al.*,2000).

Serdyuk e colaboradores empregaram a reação da polimerase em cadeia (PCR) na detecção do DNA urinário. Ainda avaliaram possíveis mutações no gene k-ras no DNA urinário em pacientes com câncer de cólon (Serdyuk *et al.*,2004).

2 OBJETIVOS

1. Analisar a instabilidade gênica em amostras de sangue, plasma e urina de pacientes portadoras de carcinoma mamário por meio da reação da polimerase em cadeia analisando a instabilidade de microsátélites ao diagnóstico, três e seis meses de tratamento quimioterápico.

2. Relacionar a instabilidade gênica encontrada nas diferentes amostras entre si, com a evolução clínica das pacientes.

3. Relacionar a concentração de DNA plasmático livre com os marcadores sorológicos utilizados na abordagem clínica do câncer de mama (CEA e CA 15.3) e com a resposta ao tratamento quimioterápico.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram incluídas 40 pacientes portadoras de câncer de mama, com confirmação de diagnóstico, encaminhadas ao Centro de Estudos em Pesquisa Oncológica da Faculdade de Medicina do ABC, Hospital Estadual Mário Covas e do Complexo de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Anchieta.

As pacientes recrutadas não poderiam ter feito uso de qualquer tratamento clínico antineoplásico prévio. Também não houve qualquer intervenção no tratamento proposto pelo oncologista.

As pacientes incluídas poderiam estar em tratamento adjuvante, sendo a primeira amostra colhida antes da primeira infusão quimioterápica após a cirurgia.

As pacientes cujo tratamento foi classificado pelo clínico como neoadjuvante ou paliativo, também forneceram as amostras imediatamente antes da primeira infusão medicamentosa.

Após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da diretoria clínica dos Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - CAPPesq, ingressaram no presente projeto. Foram colhidos 20.0 mL de sangue total por meio de venopunção com anti-

coagulante EDTA. As amostras colhidas foram ao diagnóstico, três e seis meses após tratamento proposto pelo oncologista clínico. Além das amostras de sangue, foram colhidas também amostras de urina (amostra isolada), no mesmo intervalo de tempo em que foi efetuada a coleta de sangue. A urina foi colhida após anti-sepsia do trato gênito-urinário.

3.2 Extração de DNA da fração mononuclear do sangue periférico

Após coleta de sangue, as amostras foram homogeneizadas para realização de contagem de glóbulos brancos totais e contagem diferencial. Para a extração de DNA da fração mononuclear do sangue periférico, foi utilizado o kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) e o protocolo seguido foi: A 100µL de sangue total adicionar 500 µL da solução extratora, incubar a mistura por cinco minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação a mistura foi vertida sobre a coluna de separação do kit acoplada a um tubo coletor de volume 2 mL. Seguiu-se com uma centrifugação realizada na microcentrifuga Eppendorf 5415 C a 6800 G por 1 minuto. O conteúdo eluído no tubo coletor foi descartado. Adicionou-se a coluna 500 µl de solução extratora e centrifugou-se o conjunto a 6800 G por 1 minuto e descartou o material eluído no tubo coletor. Para a lavagem da coluna adicionou-se 500µl de solução de lavagem, tampão Tris-EDTA e etanol absoluto, e centrifuga-se a 20800 G por 3 minutos e o material eluído

foi descartado do tubo coletor a fim de limpar a coluna de interferentes e melhorar a pureza do DNA a ser eluído na etapa seguinte. A eluição do DNA consistiu na adição de 50µl de tampão Tris-EDTA a 70°C sobre a coluna centrifugou-se 6800 G por 1 minuto e foi concluída a extração do DNA da amostra.

3.3 Extração de DNA plasmático

A alíquota de 10.0 mL de sangue total colhido com EDTA, foi submetida à centrifugação a 670 g por dez minutos, transferiu-se o plasma separado para um tubo seco, seguindo-se de uma segunda centrifugação a 1250 g por dez minutos, deste material 1ml foi coletado para a extração. Esta primeira centrifugação foi necessária para evitar que as células nucleadas do sangue se rompam e a segunda centrifugação para que o excesso de proteínas seja removido do plasma e não interferisse na extração (Stemmer *et al.*,2003; Zieger *et al.*,2003).

A extração foi feita utilizando o kit GFX TM (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) seguindo o seguinte protocolo adaptado:

Em 1ml de amostra foram adicionados a 500µl de solução extratora e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos com agitação ocasional. Essa mistura foi eluída cinco vezes pela mesma coluna do kit centrifugando-a a 6800 G por 1 minuto e o material presente no tubo coletor descartado. Após esse processo seguiu-se o protocolo original do kit. Adicionou-se a coluna 500 µl de solução extratora e centrifugou-se o conjunto a 6800 G por

1 minuto e descartou-se o material eluído para o tubo coletor. Para a lavagem da coluna adicionou-se 500µl de solução de lavagem e centrifugou-se a 20800 G por 3 minutos e novamente descartou-se o eluído no tubo coletor a fim de limpar a coluna de interferentes e melhorar a pureza do DNA a ser eluído na etapa seguinte. A eluição do DNA consistiu na adição de 20µl de água MiliQ a 70°C sobre a coluna e centrifugou-se 6800 G por 1 minuto e concluindo a extração do DNA da amostra.

3.4 Extração de DNA urinário

As amostras de urina foram centrifugadas para obtenção do sedimento urinário. O sedimento foi avaliado em Câmara de Neubauer para a classificação dos achados celulares. Após contagem o sedimento foi ressuspensionado em 1.0 mL de solução salina e foram efetuadas várias lavagens com a mesma solução para evitarmos contaminação com bactérias que são freqüentemente encontradas em amostras urinárias. O DNA urinário foi extraído utilizando o kit GFXTM (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA), seguindo o protocolo adaptado para essa finalidade.

Essas amostras foram centrifugadas a 1300 G por 10 minutos para que ocorresse a sedimentação das células presentes na urina. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 1ml de solução salina (0,9% de NaCl) para a lavagem e submetido a

nova centrifugação a 1300 G por 10 minutos. O precipitado de células ressuspendido novamente em 1ml de salina e procedeu-se com a extração.

Ao material celular adicionou-se 500 µl de solução extratora encubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionada à mistura na coluna do kit. Seguiu-se com uma centrifugação realizada a 6800 G por 1 minuto. O conteúdo eluído no tubo coletor foi descartado. Adicionou-se a coluna 500µl de solução extratora e centrifugou-se o conjunto a 6800 G por 1 minuto e descartou-se o material eluído no tubo coletor. Para a lavagem da coluna adicionou-se 500µl de solução de lavagem e centrifugou-se a 20800 G por 3 minutos e descartou-se o eluído no tubo coletor a fim de limpar a coluna de interferentes e melhorar a pureza do DNA eluído na etapa seguinte. A eluição do DNA consistiu na adição de 200ml de tampão Tris-EDTA a 70°C sobre a coluna centrifugou-se 6800 G por 1 minuto e concluindo a extração do DNA .

3.5 Amplificação dos microssatélites

Em nossos experimentos foram realizadas amplificações por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) para as seqüências de microssatélites TP53-ALU, TP53-PCR15.1, BAT 40, BAT 26, APC e FMR2.

A região TP53-ALU é uma região microssatélite pentanucleotídica e a região TP53.PCR15.1 apresenta-se como uma região dinucleotídica ambas ligadas a regiões reguladoras do gene *p53*.

As regiões BAT 40 e BAT 26 são mononucleotídicas e já foram empregadas em trabalhos anteriores no estudo de instabilidade genômica induzida por quimioterapia (Fonseca *et al.*, 2005).

A região APC foi amplamente estudada nos casos de HNPCC é uma região dinucleotídica cujas alterações estão presentes tanto em tumores de alta bem como os de baixa instabilidade de microssatélites.

A região FMR2 é uma repetição pentanucleotídica ligada ao cromossomo X.

As reações de PCR empregadas nos três tipos de amostra, sangue, plasma e urina serão realizadas com os seguintes reagentes: 1,5 µl de DNA purificado (nas amostras de sangue e plasma) e 3,0 µl de DNA purificado (nas amostras de urina) 2 µl de cada primer a 10pmol 3,0 µl de desoxinucleotídeos, dATP, dCTP, dGTP e dTTP, a 200mM 0,45 µl de MgCl₂ 50µM , 3,0 µl do tampão Tris-HCl 10X, e 0,2 µl da enzima Taq polimerase o volume final foi de 25 µl, sendo o volume restante completo por água deionizada autoclavada.

Sempre que foram realizadas as reações de PCR, uma mistura de todos os reagentes excluindo-se o DNA foi submetida a condições de reação para servir como controle negativo.

As amostras foram levadas ao termociclador (MJ Research PTC200, USA) e seguiram as seguintes etapas: 1 ciclo de denaturação de 5 minutos a 94°C, e depois 35 ciclos de 1 minuto de denaturação a 94°C, 1 ciclo de anelamento a 63°C por 1minuto, 1 ciclo de 72°C de extensão por 10 minutos.

Região de microssatélite	Seqüência	Tamanho (pb)
TP53-ALU	GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA	400
	AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG	
TP53.PCR15.1	AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG	103-105
	ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C	
BAT40	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC	80-100
	GTA GAG CAA GAC CAC CTT G	
BAT26	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC	80-100
	AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	
FMR2	CGG TTA TCC CAG TTC GGC GTC TCT GGG AT	172
	TCC ACC TCC CGC TCA GTC AGA CTG CGC T	
APC	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG	96-122
	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	

Tabela 1: Sequência dos primers e tamanho dos fragmentos das regiões de microssatélites analisadas.

Após a confirmação da amplificação dos marcadores em gel de agarose 2 %, as amostras foram denaturadas com formamida e incubadas a 94°C por 5 minutos e analisadas em uma eletroforese com a utilização do equipamento GenePhor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) em géis previamente preparados GebeGel Excel 15/24 (Pharmacia Boitech, Uppsala Sweden) esse gel possibilitou uma maior resolução, de 6pb, em fragmentos de 50 a 200 pb. Após corrida eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata utilizando o aparelho Hoefer Automated Gel Stainer (Pharmacia Boitech, Uppsala Sweden), seguindo o protocolo de coloração do fabricante.

3.6 Determinação de CEA e CA15.3

As amostras de soro obtidas conforme descrito no início dessa sessão, foram submetidas ao estudo para determinação de CEA e CA 15.3. Essa determinação foi realizada por meio de método quimioluminescente utilizando reagentes da marca Siemens. As leituras foram realizadas com auxílio do aparelho IMMULITE 1000 seguindo as normas do fabricante e as boas práticas laboratoriais em análises clínicas.

3.7 Análise estatística

Foi realizado o teste t de Student para a obtenção das correlações entre a concentração de DNA plasmático livre entre as pacientes e o grupo controle. Também foram construídas curvas ROC para avaliar a especificidade e sensibilidade da concentração do DNA plasmático livre quando comparados os grupos controle e pacientes e ainda pacientes com tumores localizados e tumores metastáticos.

Os eventos observados no presente trabalho foram contabilizados para a obtenção das frequências absoluta e relativa.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição das pacientes

As 40 pacientes incluídas neste estudo apresentaram média de idade de 52,7 (36-78) (mediana de 52) anos ao diagnóstico da neoplasia mamária.

Entre as pacientes uma optou por não colher mais amostras para o estudo, porém não retirou o consentimento.

Quanto ao tratamento quimioterápico das pacientes elegíveis para análise, 11 pacientes (27,5%) foram submetidas à terapia neoadjuvante, 16 pacientes (40%) fizeram uso de terapia adjuvante, 4 (10%) cujo tratamento foi considerado paliativo.

Dentre as pacientes incluídas 3 (7,5%) participaram de um estudo clínico da eficácia do tratamento pré cirúrgico neoadjuvante com o agente antiestrogênico chamado fulvestrant, contudo tais pacientes possuíam ao diagnóstico estadios classificados como operáveis.

Os regimes de quimioterápicos empregados foram combinações de antraciclinas, inibidores de formação de microtúbulos e agentes alquilantes. Estes regimes foram: Adriamicina e Ciclofosfamida, Adriamicina e Ciclofosfamida e Paclitaxel, Fluorouracil e Epirrubicina e Ciclofosfamida, Fluorouracil e Adriamicina e Ciclofosfamida.

Os agentes alquilantes, no caso a ciclofosfamida, descritos como indutores de instabilidade genômica em pacientes (*Fonseca et al.,2005*) e

em células em cultura (Marisicano *et al.*,2008) estavam presentes em 92,5%(37) das pacientes do presente estudo.

No presente trabalho as pacientes forneceram 3 amostras de sangue, de urina e de plasma, nos tempos descritos na seção pacientes e métodos.

Das 40 pacientes incluídas neste estudo 35 foram elegíveis para avaliação da instabilidade genômica avaliada pelas regiões de microssatélites. Analisamos os marcadores de instabilidade de microssatélites citados na seção materiais e métodos do sangue periférico, urina e plasma de 35 pacientes.

As pacientes foram consideradas elegíveis para a análise quando possuíam pelo menos 2 coletas. A primeira amostra foi considerada padrão comparativo para as demais amostras obtidas durante o tratamento sistêmico.

Dessa maneira, o critério empregado na análise consistia em avaliar os fragmentos gerados por PCR em gel de poliacrilamida ao diagnóstico (amostra 0) e sua alteração durante o estudo (nas amostras 3 e 6 meses).

As pacientes com apenas 1 coleta não foram avaliadas pois não eram passíveis de avaliação comparativa que é o objetivo desse estudo.

Após a análise dos géis de poliacrilamida observamos que aproximadamente 88,57%(31) das pacientes avaliadas apresentaram pelo menos uma alteração genética seja ela perda de heterozigosidade (LOH) ou instabilidade de microssatélites (MSI) no sangue periférico. Nas amostras de sedimento urinário e plasma foram encontradas estas alterações em pelo menos uma amostra em 80% (28) dos pacientes.

As figuras 3 e 4 mostram o número de eventos de instabilidade genômica encontrado no sangue periférico. As instabilidades nas regiões BAT 26, BAT 40 apresentaram-se em maior número nas pacientes.

Figura 3: Porcentagem de eventos (instabilidade de microsatélites e/ou LOH) nos marcadores analisados.

Ao analisar a porcentagem de pacientes que apresentaram instabilidade genômica avaliadas pelas regiões de microsatélite, é importante ressaltar que embora 88,57 % das pacientes apresentarem instabilidade genômica, dos 6 marcadores avaliados, o mais expressivo foi o BAT 26 e menos foi o FMR2 (Figuras 3 e 4).

Figura 4: Porcentagem de pacientes com instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue periférico(FMSP).

A figura a seguir (Figura 5) apresenta a porcentagem de pacientes e eventos de instabilidade genômica na urina das pacientes do presente trabalho. Das pacientes, 85,8%(29) apresentaram instabilidade genômica. Nas amostras de urina foi possível observar uma significativa diminuição do número de eventos quando comparada com a fração mononuclear do sangue periférico. O perfil do acometimento dos marcadores de microssatélites também mostrou-se diferente. Observa-se que as Frações ALU e FMR2 são as que demonstraram menor redução na amostra das células do sedimento urinário.

Figura 5: Porcentagem de eventos (instabilidade de microssatélites e/ou LOH) nos marcadores analisados na urina.

Figura 6: Porcentagem de pacientes com instabilidade genômica na urina.

A concordância entre as amostras de sangue total e de plasma foi baixa (14,7%) em relação às alterações observadas nas 6 regiões de microssatélites estudadas. Quanto ao número de pacientes. O DNA plasmático apresentou mais instabilidades genômicas quando comparado à urina (figuras 7 e 8).

Figura 7: Porcentagem de acometimento das diferentes regiões de microssatélites no DNA plasmático.

Figura 8: Porcentagem de pacientes com acometimento das diferentes regiões de microssatélites estudadas no DNA plasmático.

Embora o número de eventos encontrado em porcentagem não seja muito diferente entre os marcadores de instabilidade de microssatélite, (figuras 1 a 8) a concordância do mesmo evento biológico da instabilidade de microssatélites (figura 9) não foi observada.

Figura 9: Porcentagem de concordância entre as matrizes analisadas.

Sobre o acometimento das regiões analisadas, nota-se que a região FMR2 ligada ao cromossomo X foi a mais afetada (figura 10), entre as concordantes.

Figura 10: Distribuição dos marcadores de microssatélites concordantes.

4.2 Análise da instabilidade genômica por tipo de tratamento

As pacientes foram agrupadas com a finalidade de observar o número de eventos de instabilidade genômica, as alterações da concentração do DNA plasmático. Para a avaliação da resposta ao tratamento os registros médicos das pacientes foram revisados para a classificação das pacientes com base nos exames clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos.

4.2.1 Tratamento Adjuvante

Das 16 pacientes submetidas a quimioterapia adjuvante, apenas 4 (25%) não apresentaram instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue periférico. Tal dado é compatível com trabalhos anteriores de nosso grupo de estudo (Fonseca *et al.*, 2005).

A média de eventos por paciente afetada na fração mononuclear do sangue periférico foi de 2,83 eventos por paciente, ou seja, quase 3 instabilidades no painel de microssatélites.

Número similar foi encontrado nas análises da urina destas pacientes 2 (12,5%) pacientes estáveis e 87,5% afetadas com média de 2,28 instabilidades por paciente afetada.

No plasma, também 4 pacientes não possuíam instabilidade genômica, 12 pacientes apresentaram média de instabilidades genômicas de 2,58.

Em relação à concentração do DNA plasmático nestas pacientes foi constatado que, embora em níveis mais elevados do que em pacientes livres de doença, a concentração ao longo dos tempos de coleta diminuía ou se mantinha sem alterações significativas.

4.2.2 Tratamento Neoadjuvante

Entre as 11 pacientes classificadas como quimioterapia neoadjuvante nenhuma apresentou painel de microssatélites estável no sangue periférico.

Quanto à distribuição do número de regiões afetadas as pacientes estavam amplamente distribuídas.

Figura 11: Distribuição do número de instabilidades nas diferentes regiões de microssatélites estudadas nas pacientes em neoadjuvância.

Ao se verificar a instabilidade gênica no DNA plasmático apenas 2 pacientes eram estáveis. As amostras de plasma com instabilidade gênica apresentavam em média 2,33 instabilidades por paciente.

Foi observada instabilidade gênica na urina de 9 das 11 pacientes, sendo que cada paciente afetada apresentou em média 2,44 eventos.

Em relação ao DNA plasmático foi observado que sua concentração tende a diminuir após a cirurgia. Apenas 1 paciente apresentou elevação na concentração do DNA plasmático.

Quando avaliada a segunda amostra (3 meses) as pacientes que responderam ao tratamento quimioterápico apresentaram um aumento na concentração de DNA plasmático livre em comparação ao grupo de pacientes que não responderam ao tratamento ($p=0,02$).

4.2.3 Tratamento Paliativo

Entre as 4 pacientes em terapia paliativa 25% não apresentaram instabilidade genômica no sangue periférico. As pacientes com instabilidade genética apresentaram em média 3 instabilidades.

4.3 Avaliação do DNA plasmático

No presente trabalho foram incluídas 10 mulheres doadoras livres de doença com idade inferior a 30 anos e sem histórico de câncer familiar para validar a técnica de extração do DNA plasmático livre.

Tais determinações também tinham por finalidade verificar se existia diferença entre as pacientes portadoras de neoplasia mamária e mulheres sãs. As doadoras eram mulheres com idade inferior a 30 anos e sem histórico de câncer na família.

As amostras foram processadas como descrito na sessão pacientes e métodos.

Conforme o descrito na literatura as concentrações de DNA plasmático livre encontrado nestas doadoras foi inferior quando comparada

às pacientes. A média da concentração entre as doadoras foi de 0,12µg/mL, concentrações semelhantes foram encontradas por Stemmer (Stemmer *et al.*,2003).

Os resultados obtidos por espectrofotometria são apresentados na tabela a seguir:

Doadoras	[DNA]µg/mL
D1	0,2
D2	0,0
D3	0,1
D4	0,1
D5	0,2
D6	0,2
D7	0,1
D8	0,1
D9	0,2
D10	0,0

Tabela 2: Concentração de DNA plasmático livre em doadoras sadias, determinado por espectrofotometria.

Paciente	[DNA] μg/mL	Paciente	[DNA] μg/mL
MG	42	EGS	25
MNL	16	FJLS	12
VP	50	LSP	0
SMJ	18,3	MSS	20
RSB	30	MLX	30
OS	27	ASM	2
GRF	3	VMG	26
LAMJ	1	MMS	19
NM	37	ABV	12
MAL	0	ICJ	14
NT	20	GPS	NA
AC	27	RCS	12
DBS	42	LPN	12
FMP	42	IAS	13
MIS	4	MNC	60
NGS	11,3	MSFL	36
SMSS	22,9	AG	30
JF	3	MJO	18
NNP	35	INC	1,3
ESN	0	MB	12

Tabela 3: Concentração de DNA plasmático livre nas pacientes ao diagnóstico.

A avaliação estatística comparativa entre os dois grupos nos forneceu um valor de $p < 0,001$. Tal valor nos permite afirmar que existe diferença estatisticamente significativa entre as doadoras saudáveis e as pacientes ao diagnóstico.

Também foi avaliada a relação entre a concentração do DNA plasmático livre e a presença de instabilidades na região de microssatélites.

A Tabela a seguir mostra a comparação entre os níveis de DNA plasmático livre das pacientes comparadas às doadoras livres de doença. As pacientes também foram divididas em grupos de acordo com o tipo de tratamento (Adjuvante, Neoadjuvante ou Paliativo) durante o período do estudo.

		DNA (0 meses)	DNA (3 meses)	DNA (6 meses)
Controles	Média ± DP	0,15 ± 0,05	---	---
Adjuvante	Média ± DP	20,29 ± 13,8	27,38 ± 25,6	32,8 ± 13,9
	P	0,007	0,042	0,001
Neoadjuvante	Média ± DP	27,47 ± 15,5	31,08 ± 22,8	30,75 ± 22,3
	P	< 0,0001	0,023	0,002
Paliativo	Média ± DP	15,00 ± 15,3	37,33 ± 31,8	35,75 ± 22,1
	P	0,276	0,086	0,008
Geral	Média ± DP	14,96 ± 2,6	24,41 ± 4,4	18,42 ± 3,4
	P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tabela 4: Concentrações de DNA plasmático(µg/mL) das pacientes portadoras de câncer de mama em comparação com doadoras sadias durante o período do estudo. Teste *t*-Student para amostras independentes.

Com base nesta correlação estatística foi construída uma curva ROC para avaliar a concentração de DNA plasmático em pacientes com carcinoma mamário e as doadoras saudáveis, para avaliar seu emprego na detecção da atividade tumoral (figura 12). Nesta análise obtivemos uma sensibilidade de 96,87% e uma especificidade de 100% e um $p < 0,001$.

Figura 12: Curva ROC avaliando a concentração do DNA plasmático de pacientes ao diagnóstico quando comparadas às doadoras.

Com relação ao tipo de tratamento não se observou correlações estatísticas significativas quando comparou-se a concentração do DNA plasmático em pacientes que apresentaram metástases à distância com as pacientes com tumores localizados ($p=0,233$) (figura 13).

Figura 13: Curva ROC avaliando a concentração do DNA plasmático de pacientes com tumores localizados em comparação aos tumores metastáticos.

Em relação à concentração de DNA plasmático livre e os marcadores CEA e CA15.3 não se observou nenhuma correlação significativa, também não verificamos nenhuma correlação entre as instabilidades de microssatélites e os marcadores séricos conforme exemplifica a figura 14 a seguir.

Figura 14: À esquerda avaliação dos Géis de poliacrilamida nos tempos 0, 3 e 6 meses referentes às amostras de sangue, urina e plasma para a região microssatélite TP-53 PCR15.1. À direita a representação gráfica dos marcadores CEA(ng/mL), CA15.3(U/mL) e a concentração de DNA plasmático(μg/mL) livre avaliados no mesmo período. Paciente em tratamento neoadjuvante que realizou 4 ciclos de adriamicina e ciclofosfamida (AC) e 4 ciclos de paclitaxel(T).

Conforme observado na figura acima a presença de LOH na região TP53-PCR15.1 na amostra de sangue no tempo 6 e na urina no tempo 3, enquanto que a amostra de plasma permaneceu estável, exemplificando a não concordância entre os tipos de amostra quando avaliada a instabilidade genômica.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, observamos o surgimento de instabilidade genômica através da avaliação das regiões de microssatélites em todos os tipos de amostras colhidas, sangue, plasma e urina.

Na fração mononuclear do sangue periférico a incidência encontrada de 92,5% das pacientes se encontra de acordo com os resultados obtidos por Fonseca e colaboradores (Fonseca *et al.*, 2005).

O surgimento de instabilidade de microssatélites no sangue periférico indica uma ineficiência do sistema de reparo do DNA, os agentes alquilantes podem reduzir a expressão gênica de proteínas de reparo como o hMSH2 (Fonseca *et al.*, 2005). Em modelos experimentais, linfócitos expostos à agentes alquilantes também se verifica a diminuição da expressão de tal proteína de reparo (Marsicano *et al.*, 2008) concomitante ao aparecimento de instabilidade genômica (MIS e LOH).

A homogenidade entre a quantidade de eventos encontrados em nossos resultados valida o emprego das regiões escolhidas mostrando seu direcionamento para o estudo de instabilidade de microssatélites na fração mononuclear do sangue periférico (Fonseca *et al.*, 2005).

Tais instabilidades em células da fração mononuclear podem estar relacionadas à gênese de leucemias secundárias. As leucemias secundárias apresentam mais frequentemente instabilidade de microssatélites e aberrações cromossômicas (Visani *et al.*, 2000). Visani e colaboradores associam a exposição prévia a agentes alquilantes como um fator de risco

no desenvolvimento destas leucemias, tal fato nos permite avaliar a presença das instabilidades genéticas, aqui representadas pelas regiões de microssatélite como um indicador de genotoxicidade em longo prazo, visto que tais leucemias surgem no período de 5 a 10 anos após o término do tratamento (Visani *et al.*, 2000).

A leucemia mielóide aguda (t-AML) é a mais associada ao tratamento com agentes alquilantes, como a ciclofosfamida. E o risco de seu desenvolvimento eleva-se de 1 a 2 anos tendo sua maior incidência entre 5 e 10 anos, após este período o risco diminui (Le Deley *et al.*, 2008).

Adicionando-se ao efeito leucemogênico da ciclofosfamida as pacientes com câncer de mama são muito frequentemente tratadas com combinações de antraciclinas, como a adriamicina, e agentes alquilantes. Le Deley e colaboradores avaliaram o risco do desenvolvimento de leucemias e síndromes mielodisplásicas em pacientes com câncer de mama tratadas com antraciclinas. Verificaram que estas apresentam um risco relativo superior a 3 vezes quando comparadas com outras pacientes (Le Deley *et al.*, 2008).

Estas leucemias secundárias são geralmente precedidas por síndromes mielodisplásicas, são resistentes ao tratamento e apresentam pior prognóstico.

O surgimento de instabilidades genéticas em um tecido não comprometido com a carcinogênese como a fração mononuclear nos permite uma nova abordagem sobre os regimes quimioterápicos e as suas implicações (Leone *et al.*, 2002; Marsicano *et al.*, 2008).

Não apenas as mutações em regiões gênicas alvo mas também os fenômenos epigenéticos como a hipermetilação de regiões promotoras dos genes supressores de tumor, ou ainda a deacetilação de histonas contribuem no desenvolvimento de leucemias secundárias. De modo que já se observou a metilação nos genes das proteínas do sistema de reparo do DNA. A hipermetilação do promotor do gene hMLH1 pode estar relacionada com o silenciamento e consequentemente com o surgimento das instabilidades de microssatélites observadas nos resultados do presente trabalho. (Leone *et al.*, 2002). A ineficiência do sistema de reparo encontrado pela medida da instabilidade de microssatélites nos permitiria entender em parte a gênese das translocações e deleções encontradas nas leucemias secundárias (Leone *et al.*, 2002).

Pode-se aventar a hipótese de que as regiões promotoras dos genes de reparo ou ainda de seus fatores de transcrição estejam hipermetiladas, justificando a diminuição da expressão de tais proteínas consequentemente gerando as instabilidades de microssatélites. Tal fenômeno epigenético possui tamanha relevância que novos esquemas terapêuticos implementam agentes desmetilantes com a finalidade de prevenir o surgimento de tal fenômeno (Leone *et al.*, 2002).

Sobre as amostras de sangue, ainda se faz necessário questionar seu emprego como padrão de comparação com o tumor, realizado principalmente para os casos de HNPCC, visto que essas regiões apresentam variações devido ao tratamento o que comprometeria sua fidelidade com a estabilidade genética (Fonseca *et al.*, 2005).

Ainda nesse estudo, nos propusemos a avaliar o acometimento de diferentes matrizes biológicas expostas ao tratamento sistêmico. Dessa maneira, verificamos que os resultados obtidos em amostras de sedimento urinário apresentaram pouca concordância quando comparados com os resultados da fração mononuclear. Talvez, a exposição de diferentes matrizes biológicas ao tratamento sistêmico nos permita avaliar diferentes resultados de instabilidade genômica mostrando que cada célula possui sua suscetibilidade a genotoxicidade e ainda essa verificação pode refletir diferentes interpretações quanto a funcionalidade do sistema de reparo do DNA e do envolvimento epigenético.

Das pacientes avaliadas, 62,5% dessas apresentaram instabilidade de microssatélites na análise do sedimento urinário, tal dado nos mostra que a matriz avaliada pode apresentar menor sensibilidade quando comparada com a fração mononuclear do sangue periférico quando utilizado o mesmo painel de marcadores de microssatélites. Assim, sugere-se que os marcadores poderiam ser complementados com outros para serem usados nas amostras do sedimento urinário. Ressalta-se que estes marcadores haviam sido validados para análise da instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue periférico de mulheres com câncer de mama (Fonseca *et al.*, 2005).

Molina e colaboradores reportam o emprego da instabilidade de microssatélites no diagnóstico do câncer de bexiga com uma elevada sensibilidade, no entanto empregando um painel de microssatélites diferente do usado em nossa avaliação e ainda no referido trabalho são estudadas

células diretamente relacionadas com a carcinogênese no estudo com câncer de bexiga (Molina *et al.*, 2003).

As instabilidades de microssatélites encontradas no câncer de bexiga demonstram papel importante na carcinogênese sendo apontadas como um possível achado precoce de diferenciação celular em lesões pré-malignidade, pois são encontradas em estágios iniciais da neoplasia (Zulueta *et al.*, 1993).

A Ciclofosfamida, agente alquilante presente nos regimes de 80% das pacientes, se apresenta como um fator de risco estabelecido para o câncer de bexiga. Travis e colaboradores descreveram que doses cumulativas de ciclofosfamida de 50g acarretam em um aumento de 14,5 vezes mais chance do desenvolvimento do câncer de bexiga (Travis, 2006).

A ciclofosfamida empregada nos regimes antineoplásicos, após ativação hepática e reações subsequêntes é biotransformada em aldosfosfamida e acroleína, o primeiro composto possui atividade contra as células neoplásicas e o segundo é um potencial causador de cistite hemorrágica (Hardman *et al.*, 1996).

Cox e colaboradores relatam que a acroleína é capaz de inibir a enzima DNA metilase, interrompendo a metilação e consequentemente silenciamento gênico, o mesmo composto ainda é capaz de se ligar ao próprio DNA formando aductos que impossibilitam a metilação dos ácidos nucléicos (Cox *et al.*, 1988).

Desta forma a gênese das instabilidades genômicas nas amostras de sedimento urinário pode ser oriunda da hipometilação do DNA, um evento epigenético mais freqüente em regiões repetitivas como os microssatélites

(Ehrlich *et al.*, 2002). Tal achado corrobora com a pouca concordância encontrada em nosso trabalho entre as amostras do sedimento urinário e o sangue periférico indicando diferentes mecanismos para as instabilidades de microssatélites encontradas (Ehrlich *et al.*, 2002; Leone *et al.*, 2002). Esta diferença de origem das instabilidades genéticas encontradas também poderia ajudar a explicar a razão pela qual encontramos pacientes com painel de microssatélites normal no sangue periférico e instável no sedimento urinário (Ehrlich *et al.*, 2002).

Nos regimes de altas doses de ciclofosfamida o agente uroprotetor metexano é largamente empregado para evitar lesões na bexiga, por meio da neutralização da acroleína por seus radicais sulfidrila (Hardman *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1988).

Foi possível verificar que em pacientes que não apresentaram instabilidade genômica no sangue periférico apresentaram instabilidade nas amostras de urina. Ainda em pacientes com instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue apresentaram um perfil de instabilidade genômica diferente, o que nos permite afirmar que as células do trato genito urinário são afetadas de maneira diferente pelos regimes quimioterápicos.

Com os avanços nas técnicas diagnósticas e no aumento da sobrevida dos pacientes com neoplasias primárias se faz necessária uma nova abordagem dos riscos em longo prazo dos tratamentos empregados.

Devido à genotoxicidade avaliada pela instabilidade das regiões de microssatélites encontradas nas matrizes estudadas no presente trabalho, permite-se aventar a hipótese de que agentes citoprotetores como a

Amifostina poderiam ser empregados para evitar o surgimento deste fenômeno, tal avaliação foi observada em culturas de células de câncer de mama (Marsicano *et al.*, 2008). Neste trabalho os linfócitos tratados com Amifostina não apresentaram instabilidade de microssatélite quando expostas ao melphalano (agente alquilante que não necessita de metabolismo de primeira passagem).

Os resultados encontrados para as amostras de DNA plasmático foram mais discordantes do que a urina em relação ao sangue periférico. As discordâncias dos eventos encontrados entre o plasma e a fração mononuclear nos isolam da possibilidade da contaminação do plasma por DNA do sangue periférico. Essa diferença entre os perfis de instabilidade de microssatélites destas amostras pode ser explicada pela origem do DNA. O DNA avaliado na fração mononuclear do sangue tem origem nas células do sangue e não está relacionado com o tumor primário, já o DNA plasmático apresenta sua origem no tumor, refletindo portanto, o comportamento da neoplasia primária frente ao tratamento.

Contudo, a não reprodução da homogenidade dos eventos observados tanto na urina quanto no plasma sugere que o painel estudado no sangue periférico não seja o mais adequado para as outras duas matrizes avaliadas.

É importante notar que o DNA presente em baixas concentrações em indivíduos sadios pode ser oriundo de apoptose e lise celular, contudo Umetani avaliou seqüências repetidas e observou que os fragmentos de DNA plasmático oriundos de apoptose não apresentam mais de 200 pares

de base, fato que nos permite avaliar com segurança seqüências maiores do que esta neste tipo de amostra (Umetani *et al.*,2006).

Schwarzenbach e colaboradores reportam 50% de perdas de heterozigosidade ao analisar no plasma, a instabilidade de microssatélites em *loci* que apresentam alterações específicas nos tumores (Schwarzenbach *et al.*,2004).

Assim como Schwarzenbach, encontramos em nosso trabalho mais instabilidades genômicas de LOH do que de MSI, contudo observamos uma maior incidência da MSI nas amostras de plasma (Schwarzenbach *et al.*,2004).

Possivelmente a análise da instabilidade genômica encontrada no DNA plasmático livre reflita o surgimento de quimioresistência por parte do tumor primário. Adicionalmente poderíamos aventar que os genes de reparo das células tumorais não conseguiriam encaminhar estas células para a morte celular após a ligação dos agentes alquilantes à fita de DNA.

Ao avaliarmos as médias de concentração do DNA plasmático das amostras com instabilidade genômica com as que não apresentam tal fenômeno não encontramos diferença significativa. Desta forma é possível aventar que o aumento da concentração do DNA plasmático seja um fenômeno do próprio desenvolvimento tumoral, ao passo que o surgimento de instabilidades de microssatélite neste tipo de amostra componha uma avaliação da genotoxicidade dos tratamentos anti-neoplásicos intra tumoral (Schwarzenbach *et al.*,2004).

As concentrações de DNA plasmático livre encontrado nas amostras tanto estáveis quanto instáveis, embora possuam concentrações parecidas podem divergir quanto à integridade do material genômico liberado na circulação. Umetani e colaboradores propõem que a integridade do DNA plasmático é um marcador para a progressão dos tumores e ainda para metástase linfonodal (Umetani *et al.*, 2006).

Trabalhos anteriores como o de Schawrzenbach, ao avaliar os marcadores séricos frente à concentração de DNA plasmático também não obtiveram correlações entre estes parâmetros (Schwarzenbach *et al.*, 2004).

No caso do CEA e CA 15.3 são antígenos carboidratos que se encontram na superfície celular, o CA 15.3 inclusive da superfície do tecido epitelial de mama, esses se apresentam aumentados frente ao crescimento tumoral. Já o DNA plasmático livre é liberado no plasma pelos tumores devido a fenômenos como a necrose, a morte por desprendimento anoikis, colapso mitótico e a morte celular devido à ação dos tratamentos antineoplásicos.

A não concordância entre as instabilidades genômicas observadas nas diferentes amostras propõe uma genotoxicidade diferente em cada matriz celular avaliada, seja ela a fração mononuclear do sangue periférico, a urina ou ainda o DNA plasmático de origem tumoral (Umetani *et al.*, 2006).

Contudo, a concordância encontrada nos marcadores pode nos remeter a uma maior sensibilidade das regiões avaliadas. A região FMR2 (localizada no cromossomo X) que apresentou uma concordância de 37,98% entre as matrizes analisadas poderia ser mais suscetível à ação genotóxica

dos agentes alquilantes empregados no tratamento das pacientes (Deitmeier *et al.*, 1997).

Sobre a concentração do DNA plasmático podemos observar uma diferença significativa entre sua concentração quando avaliamos doadoras sadias e pacientes portadoras de carcinoma mamário ao diagnóstico ($p < 0,001$), tal averiguação permite avaliar a liberação de DNA plasmático como uma ferramenta diagnóstica, ou ainda como uma via de acesso à biologia tumoral.

Nas amostras do presente trabalho colhidas durante o tratamento de pacientes submetidas à terapia neoadjuvante, foi obtida uma correlação de $p = 0,02$ quando comparou-se a concentração do DNA plasmático livre das pacientes que responderam ao tratamento em relação ao grupo de pacientes que não responderam ao tratamento.

Novos estudos que avaliem a composição e integridade deste DNA possibilitarão novas avaliações sobre a cinética da liberação dos ácidos nucléicos.

Sobre o aumento da concentração do DNA plasmático livre após o início do tratamento quimioterápico neoadjuvante poderia ser interpretado como o DNA de células tumorais mortas pelo tratamento quimioterápico liberadas na circulação sanguínea, desta forma não refletindo a progressão da doença, mas como resultado da terapia citotóxica. Este fato permite cogitar o uso do DNA plasmático livre como avaliador da resposta terapêutica no tumor.

A caracterização deste DNA em necrótico ou apoptótico proposta por Umetani e colaboradores pode ser de grande importância na avaliação do DNA liberado pelo tumor a fim de identificar o DNA liberado devido ao tratamento e o liberado pelo próprio crescimento tumoral (Umetani et al., 2006; Frattini *et al.*, 2008).

Frattini associa a elevação do DNA plasmático livre em pacientes com doença recorrente em casos de câncer de colo retal. No mesmo trabalho o seguimento dos pacientes foi maior frente ao realizado em nossas avaliações, portanto novos estudos que acompanhem as pacientes por maiores períodos de tempo poderão verificar se tal achado também pode ser empregado em casos de carcinoma mamário (Frattini *et al.*, 2008).

Com base nos resultados do presente trabalho pode-se observar um padrão distinto da genotoxicidade induzida pela terapia antineoplásica nas três matrizes avaliadas, fração mononuclear do sangue periférico, sedimento urinário e DNA plasmático livre. Tais diferenças estão relacionadas tanto à origem do DNA avaliado, quanto aos mecanismos envolvidos e as consequências destas alterações genéticas.

Quanto às implicações das concentrações do DNA plasmático podemos aventar seu emprego como um potencial marcador de resposta terapêutica e não de crescimento tumoral como os marcadores séricos. Estudos de caracterização deste DNA poderão fornecer informações sobre a resistência aos regimes antineoplásicos.

6 CONCLUSÕES

1. Foram encontradas instabilidades genômicas nas regiões de microssatélites analisadas nas amostras de sangue, sedimento urinário e plasma das pacientes incluídas neste estudo.

2. As instabilidades nas regiões de microssatélites encontradas nas diferentes amostras não concordam entre si, sugerindo uma vulnerabilidade genômica distinta entre os tipos de matrizes analisadas.

3. A concentração de DNA plasmático livre não se correlacionou com os marcadores séricos CEA e CA15.3 usados na abordagem clínica do câncer de mama. O aumento da concentração do DNA plasmático em pacientes que responderam objetivamente à quimioterapia neoadjuvante poderá se constituir em um novo marcador para casos em neoadjuvância. Estudos confirmatórios estão em curso para averiguar esta possibilidade.

7 REFERÊNCIAS

Aaltonen L, Peltomaki P, Leach F, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin J, Jarvinen H, Powell S, Jen J, Hamilton S, Petersen G, Kinzler K, Vogelstein B, De la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260: 812-816.

American Cancer Society disponível em: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_2X_What_are_the_risk_factors_for_breast_cancer_5.asp último acesso em 03/06/2008.

Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E. Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:839-44.

Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot, I, Labuda D, Sinnett D. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br.J.Cancer*. 1999; 79 (7-8):1012-1017.

Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T, Kleiber K, Cardoso F, Lobelle JP, 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 (5) 693-698.

Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al. 2000. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from Cells Dying in an Organism. *Clinical Chemistry*. 2000; 46:1078-1084.

Browne BC, O'Brien N, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N. HER-2 signaling and inhibition in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 May; 9 (3):419-38.

Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Genet*. 1999; 33:533-64.

Casorelli I, Offman J, Mele L, Pagano L, Sica S, D'Errico M, Giannini G, Leone G, Bignami M, Karran P. Drug treatment in the development of mismatch repair defective acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2 (5):547-559.

Contran RS, Kumar V, Collins TC. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, 1999, Philadelphia USA.

Cox, R.; Goorha, S.; Irving, C.C. Inhibition of DNA methylase activity by acrolein. *Carcinogenesis*. 1988; 9 (3):463-465.

Deitmeier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic Microsatellite instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression. *Molecular research*. 1997 Nov; 57:4749-4756.

Devita JR VT, Hellman S, Rosenberg SA. *CANCER Principles & Practice of Oncology*. J. B. Lippincott Company, 1993; Philadelphia USA.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21(35), 5400-5413.

Fernandes ETA, Manivel JCA, Reddy PK, Ercole CJ. Cyclophosphamide Associated Bladder Cancer--A Highly Aggressive Disease: Analysis of 12 Cases. *The Journal of Urology*. 1996 Dec; 156 (6):1931-1933.

Fonseca FLA, Santana AVL, Bendit I, Arias V, Costa LJ, Pinhal AA, del Giglio A. Systemic chemotherapy induces microsatellite instability in the peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients. *Breast Cancer research*. 2005; 7 (1):28-32.

Fonseca FLA, Soares HP, Manhani AR, Bendit I, Novaes M, Zatta SM, Arias V, Pinhal MA, Weinscheinker P, del Giglio A. Peripheral blood c-erbB-2 expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Clinical Breast cancer*. 2002 Aug; 3 (3):201-205.

Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator *J. Med. Genet.* 2004; 41;1-5

Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, Sozzi G, Bertario L, Leo E, Pilotti S, Pierotti MA. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2008 May; 18;263 (2):170-81.

Fu Q, Yao GY, Tang XL, Chen LR, Zheng ZX. Microsatellite instability and allele-specific chromosome 3p deletion in breast cancer and precancerous lesions. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2007 Jan;29 (1):34-40.

Fujii S, Takeshima Y, Arihiro K, Kaneko M, Inai K. Microsatellite instability in breast cancers with special reference to patients' age and bilaterality. *Hiroshima J.Med.Sci*.1998; 47 (3):89-97.

Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Olinski R. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res*.2003; 63 (16): 4899-4902.

Halford SE, Sawyer EJ, Lambros MB, Gorman P, Macdonald ND, Talbot IC, Foulkes WD, Gillett CE, Barnes DM, Akslen LA, Lee K, Jacobs IJ, Hanby AM, Ganesan TS, Salvesen HB, Bodmer WF, Tomlinson IP, Roylance, RR. MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J.Pathol*. 2003; 201 (3): 389-394.

Hardman, JG, Limbrid LE. Goodman & Gilman: *As bases farmacológicas da terapêutica*. McGraw-Hill, 9ª edição,1996, Rio de Janeiro.

Instituto Nacional do Câncer INCA: disponível em: www.inca.org.br. Último acesso em 01 de agosto de 2009.

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: 558-561.

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(4):234-238.

Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005 Feb;4(2):139-63.

Johnson PJ, Lo YMD. Plasma Nucleic Acids in the diagnosis an Management of Malignant Disease. *Clinical chemistry*. 2002; 48(8):1186-1193.

Katz JP, Kaestner KH. Celular and Molecular mechanisms of carcinogenesis. *Hematology/oncology clinics of North America* 2003; 17(2).

Kim DJ, Park JY, Lee MH, Sohn YK. The role of microsatellite instability at chromosome 11p15.5 in the progression of breast ductal carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2004 Oct;19(5):698-703.

Kondo E, Horii A, Fukugigue S. The interaction domains of three MutL heterodimers in man:hMLH1 interacts with 36 homologous amino acids residues within hML3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic acids research*. 2001; 29(8):1695-1702.

Lawes DA, Sen Gupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *European Journal of Surgical Oncology*. 2003; 29:201-212.

Le Deley MC, Suzan F, Cutuli B, Delaloge S, Shamsaldin A ; Linassier C, Clisant S, De Vathaire F, Fenaux P, Hill C. Anthracyclines, mitoxantrone, radiotherapy, and granulocyte colony-stimulating factor : Risk factors for leukemia and myelodysplastic syndrome after breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25(3): 292-300.

Leon SA, Shaphirpo B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. 1977; 37:646-650.

Leone G, Teofili L, Voso MT, Lübbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica*. 2002 Dec;87 (12):1324-41.

Li Y, Hahn D, Holzgreve W, Hahn Sinuhe Ready Detection of Donor-Specific Single-Nucleotide Polymorphisms in the Urine of Renal Transplant Recipients by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry *Clinical Chemistry* 2005; 51 (10): 1-5.

Li H, Myeroff L, Kasturi L, Krumroy L, Schwartz S, Willson JK, Stanbridge E, Casey G, Markowitz S. Chromosomal autonomy of hMLH1 methylation in colon cancer. *Oncogene*. 2002, 21 (9):1443-9.

Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *PNAS*. 2008; 105:1680-1685.

Lulé LBJ, Pourrat JP, Fournié GJ. Extracellular DNA in Blood and Urine as a Potential Marker for Cytotoxicity and Nephrotoxicity in the Mouse. *Renal Failure*. 1990; 12 (3):133-139.

MacMahon B. Epidemiology and the causes of breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2006; 118 (10): 2373-2378.

Marsicano SR, Delgado PO, Pinto J L F, Santana, AVL., del Giglio A, Fonseca, FLA. Developing of in vitro model to asses genomic instability due alkylating agents in cell lines (MCF-7 and lymphocytes). In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Aguas de Lindoia. SBBq - Program of the XXXVII Annual Meeting - 2008. São Paulo : SBBq, 2008. (1): 110-110.

Molina BR, Millán Salvador JM, Oltra Soler JS. Microsatellite analysis in exfoliated cells from urinary sediment. Its utility for the detection of bladder cancer. Comparison with urinary cytology. *Actas Urol Esp*. 2003 Sep;27 (8):618-628.

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 (17):4021-4027.

Pizzi C, Panico L, De Marchis L, Mastranzo P, Di Maio M, D'Amico C, Limite G, Pettinato G, Coccozza S, Bianco AR, Contegiacomo A. p53 expression is decreased in primary breast carcinomas with microsatellite instability. *Breast Cancer Res Treat*. 2002 Jun;73 (3):257-66.

Saphiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*, 1983. 51:2116-2120.

Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, Pantel K. Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun;1022:25-32.

Serdyuk OI, Botezatu IV, Shelepov VP, Potapova GI, Alekhina RP, Molyaka YK, Anan'ev VS, Knysh VI, Melkonyan OS, Umanskii SR and Lichtenshtein AV. Detection of Mutant K-RAS Sequences in the Urine of Cancer Patients *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2001 Mar; 131(3): 283-284.

Shao ZM, Nguyen M. Tumor-specific DNA in plasma of breast cancer patients. *Anticancer Drugs*. 2002 Apr;13 (4):353-7.

Siah PS, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RLP Suthers G, Rudzki Z. Microsatellite instability markers in breast cancer: A review and study showing MSI was not detected at 'BAT25' and 'BAT26' microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2000; 60: 135-142.

Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, San Martin S, Espana P, Bonilla F. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res*.1999; 59 (13):3251-3256.

Singletary SE. Collective review A working model for the time sequence of genetic changes in breast tumorigenesis. *Journal of the American College of Surgeons*. 2002; 194 (2).

Sozzi G, Conte D, Marianil, LO Vullo, Roz L, Lombardo C, *et al*. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001; 61:4675-8.

Stemmer C, Beau-Faller M, Pencreac'H E, Guerin E, Schneider A, Jaqmin D, Quiox E, Gaub MP. Use of magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation Of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. DOI:10.1373/clinchem.2003.020750.

Strazzullo M, Cossu A, Baldinu P, Colombino M, Satta MP, Tanda F, De Bonis ML, Cerase A, D'Urso M, D'Esposito M, Palmieri G. High-resolution methylation analysis of the hMLH1 promoter in sporadic endometrial and colorectal carcinomas. *Cancer*. 2003; 98 (7):1540-6.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederry C, Beljanskim. Neoplastic characteristics of the DNA found in plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46:318-322.

Taback B, Fujihara Y, Hang HJ, Fosfag JL, Morton DL, Honn DSL. Prognostic Significance of circulating Microsatellite markers in Plasma of Melanoma Patients. *Cancer research*. 2001; 61,5723-5726.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260: 816-819.

Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J, Gospodarowicz MK, Wachlder S, Inskip PD, Tucker MA, Boice Jr J D, Bladder and Kidney Cancer Following Cyclophosphamide Therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995 Apr; 87 (7): 524-531.

Travis LB, The Epidemiology of Second Primary Cancers Cancer. *Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Nov;15 (11): 2020-2026.

Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon SBD. Prediction of breast tumor progress by integrity of Free Circulating DNA in Serum. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24 (26): 4270-4275.

Visani G, Pagano L, Pulsoni A, Tosi P, Piccaluga PP, Pastano R, Grafone T, Malagola M, Isidori A, Tura S. Chemotherapy of secondary leukemias. *Leuk Lymphoma*. 2000 May;37 (5-6):543-9.

Wang GB, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaune K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shin IM. Increased Plasma DNA Integrity in Cancer Patients. *Cancer research*. 2003; 63: 3966-3968.

Watanabe Y, Nakajima H, Nozaki K, Ueda H, Obata K, Hoshiai H, Noda K. Clinicopathologic and immunohistochemical features and microsatellite status of endometrial cancer of the uterine isthmus. *Int.J.Gynecol.Pathol*. 2001; 20 (4):368-373.

Wild PJ, Reichle A, Andreessen R, Rockelein G, Dietmaier W, Ruschoff J, Blaszyk H, Hofstadter F, Hartmann A. Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *Clin.Cancer Res*. 2004; 10 (2): 556-564.

Young LC, Hays JB, Tron VA, Andrew SE. DNA Mismatch Repair Proteins: Guardians Against Genomic Instability and Tumorigenesis Induced by Ultraviolet Photoproducts. *The Society for Investigative Dermatology*. 2003; 121:435-440.

Ziegler A, Zangmeister R, Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: A new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev.* 2002; 28:255-71.

Zulueta MG, Ruppert JM, Tokino K, Tsai YC, Spruck III CH, Miyao N, Nichols PW, Hermann GG, Horn T, Steven K, Summerhayes IC, Sidransky D, Jones PA. 3 Microsatellite instability in Bladder Cancer *Cancer Research.* 1993 Dec; 53: 5620-5623.

8 ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA ABC
Alameda Paulista, 1900 - Jd. Paulista
05508-900 - São Paulo, SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E INFORMAÇÃO À PACIENTE

PROJETO DE PESQUISA: DNA Plasmático e Urinário em Pacientes com Câncer de Mama – Possibilidade de Um Novo Marcador de Instabilidade Genética Tumoral Induzida por Quimioterapia.

Investigador Principal: Prof. Dr. Auro del Giglio

INTRODUÇÃO:

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa clínica, portanto antes que concorde, é importante que você compreenda porque ela está sendo realizada e o que é necessário para a sua participação. Solicitamos que leia com atenção as informações a seguir e que faça perguntas, se houver algum ponto que não estiver claro.

OBJETIVO:

Sabemos que a quimioterapia que você irá receber deverá matar as células de seu tumor que possam ainda estar circulando em seu corpo, mesmo depois dos tratamentos que você recebeu. A quimioterapia mata estas células malignas alterando moléculas de ácidos nucléicos chamadas DNA que estão dentro do núcleo das células do tumor e também de células normais. Sabemos que as alterações produzidas pela quimioterapia no DNA das células tumorais são geralmente muito mais tóxicas nas células do tumor do que nas células normais.

Temos como objetivo nesta pesquisas avaliar um tipo especial de alteração que a quimioterapia que administramos normalmente para nossas pacientes com câncer de mama pode produzir nos ácidos nucléicos das células do tumor de mama e nas células normais do sangue. Esta alteração se chama instabilidade de microssatélites. Além disso, visamos também avaliar se há mudanças na quantidade de ácidos nucléicos que o tumor solta no sangue e possivelmente também na urina durante o tratamento.

O QUE ACONTECERÁ CASO EU ACEITE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Se você já foi operada da mama, precisaremos fazer uma coleta do seu sangue e da sua urina antes de cada aplicação de quimioterapia na mesma ocasião em que você deveria estar colhendo os exames de sangue de rotina que nós precisamos para poder aplicar o seu tratamento de quimioterapia, mesmo que você não estivesse participando deste estudo. Seu sangue e urina também serão colhidos sempre que você tiver que colher exames de sangue para seu seguimento. O estudo durará cerca de 18 meses.

Se você ainda não foi operada, precisaríamos além de colher seu sangue e sua urina, de um raspado indolor de sua bochecha (nós passamos como se fosse um palito de sorvete na parte de dentro da sua boca, como se você fosse escovar os dentes para colher este material), de um pequeno pedaço do tumor do material que o médico já colhe para fazer sua biópsia e também do material que será retirado de você quando você for fazer a cirurgia de mama.

BENEFÍCIOS

É possível que você não obtenha nenhum benefício direto com a sua participação neste estudo, porém a sua participação poderá contribuir com informações úteis que, no futuro, poderão ajudar outras mulheres com a mesma doença que a sua.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A decisão de participar ou não deste estudo é sua e mesmo que você o recuse, será tratada igualmente em nosso serviço com o mesmo tratamento de quimioterapia convencional. Se durante a sua participação você decidir se retirar do estudo terá total liberdade para isso, sem que seja necessário fornecer o motivo da sua desistência, sendo importante que informe ao médico caso queira desistir.

CUSTO FINANCEIRO

Você não terá nenhum custo financeiro envolvido na sua participação neste estudo. Não lhe será também paga nenhuma gratificação por participar dele.

CONFIDENCIALIDADE

Todas as informações pessoais do seu tratamento serão mantidas confidenciais. Você não será identificada em qualquer publicação ou apresentação deste estudo.

DÚVIDAS E CONTATOS

Se você tiver qualquer dúvida, pode me procurar na Disciplina de Oncologia e Hematologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC na Rua Príncipe de Gales 821, Santo André, no telefone (11) 4993-5400 / 4993-5491.

Eu _____ confirmo que li, discuti e entendi, todas as informações contidas neste termo e concordo de livre espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do Paciente

____/____/____
Data

Assinatura da Testemunha 1

____/____/____
Nome em letra de forma Data

Assinatura da testemunha 2

____/____/____
Nome em letra de forma Data

Assinatura do Investigador Principal.
Prof. Dr. Auro del Giglio

____/____/____
Data

Anexo 2 - Tabela de avaliação dos dados clínicos

	IDADE	ER(%)	PR(%)	Cerb b2 (+)	Ki67 (%)	tratamento	Tipo de tratamento	Estadio
MG	45	60	90	2		AC	1	I
MNL	58	0	0	0		AC-T	1	IIA
VP	57	90	0	2		FEC100	1	IIA
SMJ	69	40	60	0		FAC	1	IIA
RSB	55	20	70	1	20	HT	2	IIB
OS	41	0	0	0		AC-T Herceptin	2	IIIA
GRF	49	0	0	0		AC-T	2	IIIA
LAMJ	51	80	0	0	40	AC-T	1	IIIA
NM	50	30	30	2	nc	AC-T	2	IIIA
MAL	63	70	90	2	50	HT	2	IIIA
NT	42	90	0	0	0	AC-T	1	IIIA
AC(direita/esquerda)	36	80/0	20/0	0/0		TAC	2	IIIB
DBS	55	50	0	3		AC-T	2	IIIB
FMP	67	2	40	0	2	HT	2	IIIB
MIS	43	15	15	0	0	AC	3	IV
NGS	45	0	0	3		AC-T	2	IIIB
SMSS	40	0	0	0		AC-T	2	IIIB
NNP	51	90	70	2		AC	3	IV
ESN	54	15	15	0	0	TAC	1	IIB
EGS	47	30	70	2	2	AC	1	IIIA
FJLS	55	60	0	0		FAC	1	IIA
LSP	56	60	15	0	50	AC-T	2	IIIB
MSS	41	15	65	2	15	AC-T	1	IIIB
MLX	60					AC	2	
ASM	78	90	0	0	40	AC	3	IV
VMG	43	0	15	0		AC-T	1	lib
MMS	40	60	20	2		AC-T	3	IV
ABV	66	0	0	1		FAC	2	IIB
ICJ	43	0	60	1		AC	1	IIA
GPS	66	90	100	1	0	FAC	1	IIIB
RCS	42			3		AC	1	IIIA
LPN	62	20	0	2	0	AC	1	IIA
IAS	66	0	0	2		AC-T	2	IIA
MNC	52					AC	2	IIB
MSFL	59	80	30	0		AC-T	1	
AG	42	50	90	0	25	AC	1	
MJO	47					TAC	2	
JF	68					AC-T	1	
INC	52					AC	1	
MB	53					AC-T	2	
Tipo de tratamento:	1=Adjuvante							
	2=Neoadj.							
	3=Paliativo							

Anexo 3 - Tabela de avaliação dos dados moleculares

	CEA	CA15.3	DNA Plasmático		CEA	CA15.3	DNA Plasmático
MG	0,32	29,1	42	FJLS	1,9	30,2	12
	0,4	25	69		2	25,3	20
	0,68	30	45		2,3	20,5	34
MNL	2,4	20,7	16	LSP	10,3	27,9	0
	1,5	22,5	14		4,3	27,4	40
					2,3	21	50
VP	1	8,7	50	MSS	1,7	24,8	20
	1,3	12,2	12,8		1,8	20,7	4
	0,78	11,4	49		2,2	23,9	0
SMJ	1,6	25,2	18,3	MLX	2,1	21,5	30
	2,6	20,9	42,1		1,8	17,9	41
	1,6	18,3	19,4		1,4	20,3	29
RSB	3,1	57,6	30	ASM	11,5	30	2
	0,94	26,4	50				
	0,75	30,2	42		10,4	17,2	63
OS	0,33	51,2	27	VMG	95	0,43	26
	2	30	18				
	1,3	25,3	12		24	0,65	30,8
GRF	0,71	6,2	3	MMS	6	64,3	19
	1	9,6	hemolisada		7,3	110	22
	1,1	10,6	4,8		6,5	50,8	41,9
LAMJ	2	18,9	1	ABV	3,8	29,2	12
	1,7	22,2	3		3,6	19,7	11
					3,2	13,1	18
NM	1,8	19,7	37	ICJ	1,6	22,4	14
		nc	Nc		7,7	14,7	56
	1	15,3	22		1,9	12,4	42
MAL	2,6	23,7	0	GPS	0,66	15,3	Hemólise
	1	21,3	2		0,94	13,1	15,3
	2,1	16,5	30		1,4	12,8	18,6
NT	2,4	13,7	20	RCS	0,72	16,8	12
	2,2	15,6	18		0,9	17,9	15

	2,9	14,7	31		1,5	18,7	8,1
AC	0,96	34,1	27	LPN	0,55	15,9	12
	1,8	27,3	31		1	20,3	61
	0,75	18,7	30				
DBS	4,4	30,4	42	IAS	2,6	20,7	13
	4	20,3	10				
					2,6	16,8	90
FMP	4,1	46,1	42	MNC	1,7	17,2	60
	0,96	34,1	18		2	19,1	57
	2,8	30,4	20				
MIS	0,76	47,9	4	MSFL	1,3	31,6	36
	0,66	35,6	16		2,2	37,4	74
	0,87	32,6	27,2		1,7	27,8	46
NGS	8,3	27,4	11,3	AG	2,4	30,2	30
	8,8	53	16				
	6	48	21,2				
SMSS	1,2	37,9	22,9	MJO	3,3	29,6	18
	3,6	19,7	79				
NNP	23,4	30,9	35	JF	1,8	16,3	3
	12	27,4	74				
	7,3	19,6	10,9				
ESN	1,8	17,8	0	INC	2,4	20,6	1,3
	2,2	16,1	2,5				
	2,1	21	50				
EGS	2,7	33,7	25	MB	2	15,6	12
	6	49,7	4				
	6,2	43,1	20				

	Fração Mononuclear do Sangue Periférico					
	BAT40	BAT26	FMR2	TP53PCR15.1	APC	ALU
MG	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
MNL	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	2	2
VP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
SMJ	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	1	0	0	2	1	2
RSB	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	1	1	0	1	2
OS	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	2	2	0
	0	0	0	0	2	0
GRF	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	2	2
	0	0	0	0	0	0
LAMJ	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	1	0	2
NM	0	0	0	0	0	0
	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
	0	1	1	1	0	2
MAL	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0
NT	0	0	0	0	0	0

	0	2	1	0	0	0
	0	0	0	1	0	0
AC	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
DBS	0	0	0	0	0	0
	0	1	2	0	0	0
FMP	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	1	0
MIS	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	1	1
	1	0	0	1	0	1
NGS	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	2	0
	0	2	0	0	0	0
SMSS	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0
NNP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0
ESN	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0
EGS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
FJLS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
LSP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	1	1	1	0	0
MSS	0	0	0	0	0	0

	0	0	1	1	0	1
	0	0	0	1	1	0
MLX	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	2	0	0
	1	2	0	0	1	0
ASM	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
VMG	0	0	0	0	0	0
	1	2	0	0	0	0
MMS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
ABV	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	2	0
	0	0	0	0	0	2
ICJ	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
GPS	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	2	0
	2	1	0	0	2	0
RCS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
LPN	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
IAS	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	0	0
MNC	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	2	0	2
MSFL	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0

AG	0	0	0	0	0	0
MJO	0	0	0	0	0	0
JF	0	0	0	0	0	0
INC	0	0	0	0	0	0
MB	0	0	0	0	0	0
	10	10	7	12	6	3
	6	8	5	4	8	12
	Sedimento Urinário					
	BAT40	BAT26	FMR2	TP53PCR15.1	APC	ALU
MG	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0
MNL	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
VP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	0	0
SMJ	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	1	2
	0	0	0	0	0	0
RSB	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	2
	0	1	1	1	0	0
OS	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
GRF	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	0	2	2	0	2
LAMJ	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	2	0	0
NM	0	0	0	0	0	0

	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
	1	0	0	1	0	0
MAL	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
NT	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	2	0
AC	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	1	0
DBS	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
FMP	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	2
	0	0	2	0	0	0
MIS	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	2	0
	0	0	0	2	0	0
NGS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
SMSS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
NNP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
ESN	0	0	0	0	0	0
	0	1	2	0	0	1
	0	1	0	0	0	1
EGS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	1
FJLS	0	0	0	0	0	0

	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
LSP	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	2
	0	2	1	0	1	0
MSS	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	1
	0	1	1	0	0	1
MLX	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
ASM	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	0
VMG	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
MMS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
ABV	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	0	2	0	2	0
ICJ	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
GPS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
RCS	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	2	1	0	0	0
LPN	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	2
IAS	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	2	0

MNC	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	2	2	0
MSFL	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	1	0
	0	0	0	0	0	0
AG	0	0	0	0	0	0
MJO	0	0	0	0	0	0
JF	0	0	0	0	0	0
INC	0	0	0	0	0	0
MB	0	0	0	0	0	0
	3	3	10	4	6	6
	1	4	10	4	5	11
	Plasma					
	BAT40	BAT26	FMR2	TP53PCR15.1	APC	ALU
MG	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
MNL	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	0
VP	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
SMJ	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	2	0	0
	0	0	2	0	0	0
RSB	0	0	0	0	0	0
	2	0	2	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
OS	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	2	0
	0	2	1	0	0	2
GRF	0	0	0	0	0	0

	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
LAMJ	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	2	0
NM	0	0	0	0	0	0
	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	0	0	0	0	0	0
MAL	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
NT	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	0	0	0
AC	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	1	0
	0	0	1	1	0	0
DBS	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
FMP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	2	0	2
MIS	0	0	0	0	0	0
	0	1	2	2	0	0
	0	1	0	0	0	0
NGS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
SMSS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
NNP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
ESN	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1	2

	1	1	0	1	1	0
EGS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	0	1
FJLS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
LSP	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	2	0
	1	0	1	0	0	0
MSS	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	1	0
MLX	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
ASM	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
VMG	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
MMS	0	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
ABV	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	0	0
ICJ	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
GPS	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
RCS	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0

LPN	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	2	2
IAS	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0
MNC	0	0	0	0	0	0
	0	0	2	0	0	0
MSFL	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
AG	0	0	0	0	0	0
MJO	0	0	0	0	0	0
JF	0	0	0	0	0	0
INC	0	0	0	0	0	0
MB	0	0	0	0	0	0
Avaliação das regiões microssatélites: 0=estável, 1= LOH e 2 =MSI						