

**Universidade de São Paulo**

**Faculdade de medicina de Ribeirão Preto**

**ESTUDOS MOLECULARES DE TUMORES E PROCESSOS PRÉ-NEOPLASICOS  
DA MAMA HUMANA**

**NACIBE ABUTRAB**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Genética

**Orientadora: Profa. Dra. Cacilda Casartelli**

**Ribeirão Preto**

**2006**

**“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;  
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final;  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder;  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”**

**Martin Luther King**

**Ao meu pai e minha mãe que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, compartilhando meus ideais e incentivando-me a prosseguir, com o maior amor do mundo!**

**Dedico...**

## *Agradecimentos*

À minha orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cacilda Casartelli**, agradeço a confiança em mim depositada e a oportunidade da realização deste trabalho.

Agradeço especialmente aos meus pais, **Hélio e Tereza**, por todo o apoio, esforço e dedicação, que juntos puderam sempre me oferecer; por todo o carinho e amor incondicional que sempre tiveram comigo. Vocês são as pessoas mais especiais da minha vida! Obrigada por tudo!

Às minhas amadas irmãs **Mona e Mônica**, que mesmo na distância, estiveram presentes em todas as etapas da minha vida, me apoiando e incentivando a seguir em frente. Obrigada por todo o amor, carinho, amizade e por serem irmãs maravilhosas.

Aos amores da minha vida, meus sobrinhos **Igor e Rafa**, pelo imenso amor que cultivamos, por todos os sorrisos que guardo na lembrança e por saber que sempre aguardam minha chegada e fazem dela alguns dos momentos mais felizes da minha vida! E à minha especial sobrinha, **Maria Tereza**, que devido à realização deste sonho, não pude vê-la nascer. Agradeço a Deus por vocês existirem!

Ao meu amor, **Cleber**, por viver comigo mais esse sonho, me apoiando em todos os momentos, acreditando em mim e sendo meu companheiro em todas as horas. Obrigada pelo teu amor sincero e por existir em minha vida. TE AMO MUITO!

Ao Seu **Dagmar**, Dona **Rosângela**, **Tati**, **Augusto** e toda a família, pelo enorme carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

Ao meu eterno cunhado **Paulo**, por seu carinho, amizade e dedicação.

À minha especial amiga **Juju**, por todos os momentos que passamos juntas, pelas longas e intermináveis conversas que nos fortaleceram e pelo carinho que dedica a mim. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha grande amiga e irmã do coração **Dri**, com muito amor e carinho, me acompanha desde a época da faculdade, provando que nossa amizade é capaz de vencer todos os obstáculos.

À querida amiga **Mini Vanessa**, pelos bons momentos que passamos, pela amizade e carinho.

Às minhas queridas amigas **Lu** e **Aline**, pela amizade, carinho, atenção e pelos bons momentos que passamos juntas.

Aos meus amigos **Leo** e **Giovanny**, com muito carinho, pela amizade, apoio, atenção e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de todo o trabalho. Meu muito Obrigada!

Aos amigos **Márcio Penha** e **Vanderci (Cuca)**, por toda amizade e carinho, pelos momentos de descontração e pelo valioso auxílio técnico prestado. E à Dona **Francisca** pelo carinho e atenção por mim e manutenção da ordem dentro do laboratório.

À minha eterna comadre **Cristiane** e minha afilhada **Eduarda**; minha querida amiga **Arlane** e toda sua família e a insubstituível amiga **Patrícia**, por provarem que a amizade quando é verdadeira vence o tempo e principalmente à distância. AMO VOCÊS!

À minha querida **Tia Izilda** e **Silvinha** que foram uma dádiva de Deus em minha vida nos momentos que passamos juntas em Ribeirão Preto, sempre me apoiando, incentivando e me enchendo de amor e carinho.

À amiga que conquistei em Ribeirão Preto, **Livia**, pela amizade, conselhos e bons momentos que passamos juntas nos nossos encontros semanais.

A **toda minha família** de Minas Gerais e Bahia que torceram por mim. Vocês estarão sempre em meu coração!

Aos paraenses presentes, **Ciane** e **Fábio**, e aos que já se foram **Marineide**, **Nilson**, **Plínio** e **David**, pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos médicos Drs. **Sergio Vicente Serrano e Ângelo Mathes** e às suas secretárias pelo fornecimento de material biológico de seus consultórios particulares.

Às secretarias do Departamento de Genética **Maria Aparecida, Susie e Cleuza**.

Aos **docentes** do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao laboratório do Genoma, em especial ao **Mendel**, pelo sequenciamento das amostras.

À **CNPq, CAPES, FAPESP, FAEPA** pelo apoio financeiro.

A todos vocês e àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. **Serei eternamente grata!**

Acima de tudo, agradeço ao meu **DEUS**, por tudo que realiza em minha vida e em especial a **Nossa Senhora, Mãe de Jesus**, pela concretização desse trabalho.

## Resumo

ABUTRAB, N. **Investigação de alterações moleculares em tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O câncer de mama é o mais freqüente em incidência e mortalidade no sexo feminino. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2006 é de 48.930, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. A carcinogênese constitui-se um processo de múltiplos passos, caracterizado pela ocorrência ou acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. O perfil particular dessas alterações em cada tumor é responsável pela heterogeneidade no comportamento tumoral e pelas diferentes respostas ao tratamento, observadas em cada paciente. O conhecimento das alterações moleculares específicas será crucial para a identificação de novos alvos terapêuticos e estratégias de prevenção. Os objetivos do trabalho foram analisar o espectro mutacional da região codificadora do gene PTEN em quarenta amostras de tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana, bem como avaliar o perfil de metilação da região promotora do gene MLH1 nas mesmas amostras. Para análise do gene PTEN os nove éxons foram amplificados por PCR e posteriormente analisados por SSCP, porém não foram encontradas alterações no padrão de migração. Para avaliar o perfil de metilação do MLH1, foi utilizado o método de PCR por metilação específica. Nosso resultado apresentou metilação em quatro amostras do grupo de processos pré-neoplásico e três amostras de carcinomas ductais infiltrantes. Desta forma, podemos sugerir que mutações no gene PTEN não representam pontos críticos para a gênese e evolução no câncer de mama esporádico, e que a hipermetilação da região promotora do gene MLH1, além de participar da progressão pode também estar envolvida na gênese do câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama, alterações genéticas e epigenéticas, genes PTEN/MLH1

## Abstract

ABUTRAB, N. **Investigation of molecular alterations in tumors and pre-neoplastic processes in human breast** – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, 2006

Breast cancer is most frequent in incidence and mortality in the feminine sex. It is estimated that the number of new cases of breast cancer in Brazil in 2006 will be 48.930, with an estimated risk of 52 cases for each 100000 women. Carcinogenesis is a multiple steps process, characterized by the occurrence or accumulation of genetic and epigenetic alterations. The particular profile of these alterations on each tumor is responsible for the heterogeneity in the tumoral behavior and in the different responses to treatment observed on each patient. The knowledge of the specific molecular alterations will be crucial for the identification of new therapeutic targets and strategies of prevention. Our objectives had been to analyze the mutational status of the codifying region of the gene PTEN in forty samples of malignant and benign tumors of the human breast and to evaluate the methylation profile of the promoter region of the gene MLH1 in the same samples. We screened the nine exons of the PTEN gene for mutational status by the techniques of polymerase chain reaction and single strand conformational polymorphism. No alterations in the pattern of migration were found. To evaluate de methylation profile of the gene MLH1, the technique of methylation-specific polymerase chain (MSP) reaction was used. The results of the MSP showed methylation in four samples of benign lesions and in 3 samples of infiltrative ductal carcinomas. We can suggest that mutations in gene PTEN do not represent critical points for the genesis and evolution of sporadic breast cancer and that the hypermethylation of the promoter region of the gene MLH1 participates of progression and may be involved in the genesis of breast cancer.

Keywords: breast cancer, genetic and epigenetic alterations, gene PTEN, gene MLH1

## Lista de Figuras

Figura 1 - Representação dos CpGs e das ilhas CpG no estado celular normal e na tumorigênese.....	20
Figura 2 - Diferentes mecanismos pelos quais a metilação do DNA pode promover a oncogênese .....	23
Figura 3 - Mecanismo proposto pelo qual a metilação do DNA reprime a transcrição do gene .....	25
Figura 4 - Estrutura da glândula mamária .....	28
Figura 5 - Modelo de progressão do câncer de mama .....	31
Figura 6 - Distribuição genômica dos nove éxons do gene PTEN.....	33
Figura 7 - Domínios da proteína do gene PTEN.....	34
Figura 8 - Modelo de inibição da PI – Quinase pela ação do PTEN.....	35
Figura 9 - Distribuição genômica dos treze éxons do gene MLH1 .....	37
Figura 10 - Representação esquemática da atividade do sistema MMR.....	38
Figura 11- Representação esquemática do tratamento de DNA com o reagente bissulfito de sódio.....	47
Figura 12 - Gel de poliacrilamida 8% contendo reações de MSP apresentando o perfil de metilação do gene MLH1 .....	52
Figura 13 - Resultado do sequenciamento das amostras do gene MLH1 .....	52

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências senso (S) e anti-senso (AS) dos primers e seus respectivos tamanhos em pares de base (pb) e os tamanhos dos fragmentos amplificados..... 43

Tabela 2 - Condições de PCR para o gene PTEN ..... 44

Tabela 3 - Sequências dos primers usados no MSP. pb: tamanho do fragmento esperado no MSP .... 46

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 GENES SUPRESSORES DE TUMOR .....	15
1.2 ONCOGENES.....	16
1.3 GENES DE REPARO .....	17
<b>2 EPIGENÉTICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 DNA METILTRANSFERASES .....	19
2.2 ILHAS CPG.....	19
2.3 PAPEL DA METILAÇÃO NA CÉLULA NORMAL.....	21
2.4 PAPEL DA METILAÇÃO NO CÂNCER .....	21
2.5 REMODELAMENTO DA CROMATINA.....	23
2.6 APLICAÇÕES CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS NO ESTUDO DA METILAÇÃO .....	25
<b>3 CÂNCER DE MAMA .....</b>	<b>26</b>
3.1 FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA.....	26
3.2 GLÂNDULA MAMÁRIA.....	27
3.3 PATOLOGIA .....	29
3.4 PROCESSO CARCINOGENÉTICO .....	30
<b>4 GENE SUPRESSOR DE TUMOR (PTEN) .....</b>	<b>32</b>
<b>5 GENE DE REPARO DO DNA (MLH1) .....</b>	<b>36</b>
<b>6 OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
AMOSTRA.....	42
ASPECTOS ÉTICOS.....	42
EXTRAÇÃO DO DNA.....	42
ANÁLISE DO ESTADO MUTACIONAL DO GENE PTEN .....	43
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE MLH1 .....	46

---

<b>8 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
GENE PTEN .....	51
GENE MLH1 .....	51
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
ANÁLISE DO ESTADO MUTACIONAL DO GENE PTEN.....	54
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE MLH1 .....	57
<b>10 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
GENE PTEN .....	60
GENE MLH1 .....	60
<b>11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## **1.Introdução**

---

O câncer é reconhecido como um processo complexo e multifatorial que envolve o malfuncionamento de proto-oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes relacionados à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, e à integridade do genoma (MACALUSO; PAGGI; GIORDANO, 2003).

O processo de carcinogênese é em geral lento, podendo levar vários anos para que uma célula prolifere e dê origem a um tumor palpável. Esse processo é composto de vários estágios: estágio de iniciação, em que os genes sofrem ação de fatores cancerígenos; estágio de promoção, no qual os agentes onco-promotores atuam na célula já alterada e estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula (INCA, 2005).

As células normais só se reproduzem quando são instruídas para isso e seguem uma seqüência coordenada de eventos, o ciclo celular. As células cancerosas, ao contrário, passam a seguir um programa próprio e desordenado de reprodução. No início do processo, uma célula que já tem alterações em seu material genético, herdadas ou ocorridas nela própria, sofre uma nova mutação, por acaso ou por indução de um agente capaz de gerar câncer, o que completa a ação desordenadora do processo de reprodução (KNUDSON, 1971; 1985).

Essa mutação complementar dá à célula cancerosa uma capacidade de reprodução superior à de suas irmãs do mesmo tecido, algo como uma vantagem seletiva e ela começa a se dividir, desrespeitando as regras de bom funcionamento do tecido. Forma-se, assim, um aglomerado não programado, que cresce num ritmo superior ao das células normais à sua volta. Geralmente isso ocorre décadas antes de esse aglomerado ser clinicamente detectável. Sua transformação em um tumor maligno ocorrerá através do acúmulo de mutações em classes específicas de genes que de alguma forma estão envolvidos na regulação da proliferação celular (FREIRE-MAIA; RIBEIRO, 2002; NOWELL, 1976; PONDER, 2001). Essas mutações ocorrem em três classes de genes celulares: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA (FEARON; CHO, 1996).

---

Podemos então considerar como uma célula tumoral aquela que perdeu a capacidade de controlar seu crescimento e divisão. Segundo Hanahan e Weinberg (2000) existem características marcantes no fenótipo das células cancerosas: o desrespeito aos sinais de parada de proliferação e de diferenciação celular, a capacidade de sustentar a proliferação celular, a fuga da apoptose, a capacidade de invasão e por fim a angiogênese.

### 1.1 Genes Supressores de Tumor

Os genes supressores de tumor são elementos genéticos cuja perda, inativação ou disfunção pode conferir à célula o potencial de induzir o aparecimento do fenótipo neoplásico nos tecidos onde essas alterações ocorrem. A ação recessiva de alelos mutantes desta classe de genes permite que os efeitos resultantes sejam retardados por longos períodos após a concepção. Esta é uma classe de tumores na qual há um claro padrão hereditário, geralmente autossômico dominante e uma tendência ao aparecimento em idade precoce, quando comparada aos tumores esporádicos, que surgem mais tardiamente na vida dos indivíduos. Considerando-se os cânceres hereditários, o mais estudado é o retinoblastoma. Tanto as formas hereditárias quanto as esporádicas de retinoblastoma envolvem anormalidades do cromossomo 13 (13q14). Knudson (1971), utilizando o retinoblastoma como modelo, postulou que ele é desencadeado por 2 lesões sucessivas (tais eventos seriam mutações, embora um evento epigenético como metilação, não possa ser distinguido neste modelo) no genoma celular. No retinoblastoma esporádico, ambas as lesões ocorreriam na linhagem de células da retina como mutações somáticas ocorrendo *de novo*, mas longos períodos após da concepção. No retinoblastoma familiar, uma das duas mutações seria herdada de um dos progenitores ou se originaria durante a gametogênese; a segunda mutação requerida ocorreria então como um evento somático. Posteriormente Knudson (1983, 1985, 1987, 1991) descreveu o primeiro passo como sendo a inativação de um gene

supressor de tumor e o segundo passo, a inativação de seu alelo. Esta inativação poderia ocorrer através de qualquer disfunção ou ausência deste gene. Possuindo este gene uma função normal na regulação negativa, são as mutações de perda de função que são oncogênicas. Estas incluem grandes regiões de DNA que flanqueiam os genes supressores de tumor, bem como alterações mais sutis, que resultariam em término prematuro da tradução, levando à produção de uma proteína truncada que perdeu sua capacidade funcional (BROWN, 1997).

Os genes supressores de tumor protegem a célula somática normal contra a transformação maligna. Inversamente, a herança de um alelo desse gene mutado, é fundamental na predisposição genética ao câncer nas síndromes hereditárias e antagonizam direta ou indiretamente a função de um proto-oncogene (LOURO *et al*, 2002).

## 1.2 Oncogenes

Os oncogenes compreendem um diverso grupo de genes, cujos produtos têm papéis importantes na regulação das atividades bioquímicas das células, incluindo as atividades relacionadas à divisão celular (SNUSTA; SIMMONS, 2000). Os oncogenes são herdados na forma de proto-oncogenes e exigem um evento desencadeador para iniciar a sua atividade anormal. Este evento pode consistir numa mutação que ocorre no próprio proto-oncogene, no interior de uma célula durante a mitose. Pode ser também uma anormalidade mais complicada que ocorre durante a mitose, em que o proto-oncogene passa a se localizar em alguma área que promove o potencial transformante do proto-oncogene (RAVEL, 1997). Isto resulta na ativação constitutiva da expressão do gene, sua superexpressão ou a falha na inativação da sua expressão no momento adequado, levando a modificações funcionais de seus produtos protéicos (LEWIN, 2001).

### 1.3 Genes de Reparo

Mutações que modifiquem a seqüência de nucleotídeos na cadeia original de DNA, como transição ou transversão, acarretam um pareamento inadequado das bases nucleotídicas, promovendo distorções na configuração da dupla hélice de DNA. Estes fenômenos ocorrem de forma espontânea ou induzida, porém as células possuem um complexo mecanismo de reparo do DNA, que é responsável pela correção das alterações que afetam a continuidade ou seqüência da molécula do DNA (MCGREGOR, 1999).

A integridade de DNA é garantida pelos mecanismos de reversão química direta, que ocorrem sem a necessidade de quebra do DNA e através de mecanismos de reparo por excisão, que exigem a quebra do DNA para a correção do dano. Os mecanismos de reparo por excisão são: 1) reparo de excisão de base (BER), 2) reparo de excisão de nucleotídeo (NER) e 3) reparo de excisão mismatch (MMR). Cada um desses mecanismos de reparo emprega um conjunto especializado de enzimas durante o processo de correção (LINDAHL; WOOD, 1999).

Alterações genéticas e epigenéticas que levam à perda de função nos genes de reparo do DNA possuem um papel importante na tumorigênese (MURATA *et al.*, 2002). A inativação dos genes de reparo do DNA provavelmente não afeta diretamente os processos normais de controle de crescimento; no entanto, tal inativação parece resultar em uma taxa aumentada de mutações numa variedade de outros genes, incluindo proto-oncogenes e genes supressores de tumor (FEARON; CHO, 1996; ROCKWELL *et al.*, 2001).

## 2 EPIGENÉTICA

Epigenética pode ser definida como qualquer mudança da expressão de um gene sem que ocorra alteração estrutural na seqüência de DNA (BAYLIN; HERMAN, 2000; ESTELLER; HERMAN, 2002; LAIRD, 2003; NEPHEW; HUANG, 2003; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005). A metilação é o principal fenômeno epigenético pelo qual um gene é silenciado. Ele se dá pela adição covalente de um grupo *metil*, que é transferido de um doador (*S-adenosilmetionina*) à citosina presente na estrutura do DNA. Essa reação é catalisada pela *DNA-metiltransferase* (BAYLIN; HERMAN, 2000; DERKS *et al.*, 2004; ESTELLER; HERMAN, 2002; LAIRD, 2003; MOMPALER; BOVENZI, 2000; NEPHEW; HUANG, 2003; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005; STRATHDEE; BROWN, 2002).

Greger *et al* (1989) foram os primeiros a descobrir a metilação de uma ilha CpG de um gene supressor do câncer humano, o gene retinoblastoma (Rb) . Entretanto, somente em 1994, surgiu a idéia de que a hipermetilação da região promotora da ilha CpG, poderia ser um mecanismo inativador de genes no câncer (HERMAN *et al.*, 1994), embora a verdadeira origem de eventos epigenéticos no câncer talvez tenha sido a descoberta de que a hipermetilação das ilhas CpG é um mecanismo de inativação do gene supressor de tumor p16<sup>INK4a</sup> no câncer humano (GONZALEZ-ZULUETA *et al.*, 1995; HERMAN *et al.*, 1995; MERLO *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que a metilação aberrante das regiões promotoras está associada com a perda de função dos genes supressores de tumor, o que proporciona vantagens para as células neoplásicas (mecanismo epigenético), da mesma forma que as mutações também trazem vantagens para elas (mecanismo genético) (COTTRELL, 2004; NEPHEW; HUANG, 2003).

## 2.1 DNA metiltransferases

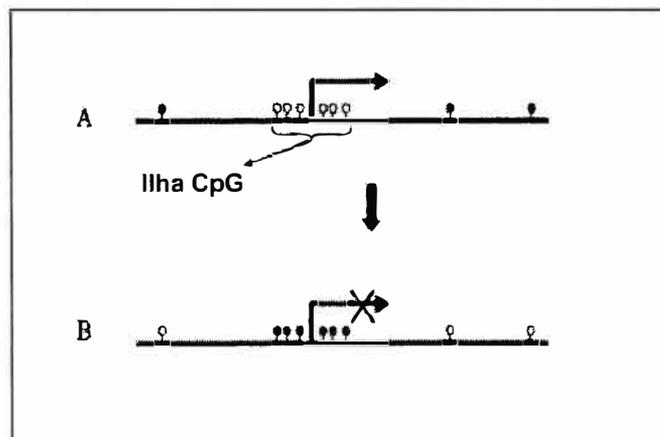
O processo de metilação é mediado pelas DNA metiltransferases (DNMTs), que são as enzimas que transferem o radical metil para a citosina e são subdivididas em DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b, sendo o alvo desta enzima o dinucleotídeo CG (GARINIS *et al.*, 2002). A DNMT1 possui afinidade por substratos hemimetilados, e apresenta também a capacidade de atuar na metilação de substratos não metilados, ou seja, metilação *de novo*. A replicação de uma seqüência metilada leva a uma seqüência hemimetilada, pois uma fita permanece metilada enquanto a fita recém-sintetizada está demetilada. As enzimas DNMT3a e DNMT3b, ao contrário da DNMT1, não apresentam preferência por DNA hemimetilado e suas funções relacionam-se principalmente com a metilação *de novo*. As conseqüências da metilação de citosinas nas regiões promotoras sugerem que este mecanismo inibe a transcrição gênica, impedindo seu início (ESTELLER, 2000; 2005a; c; LAIRD, 2003; 2005; SINGAL; GINDER, 1999; WAJED; LAIRD; DEMEESTER, 2001).

## 2.2 Ilhas CpG

A metilação das citosinas nos dinucleotídeos CpG é uma característica comum dos genomas eucarióticos (COSTELLO; PLASS, 2001). No genoma humano, os dinucleotídeos CpG estão presentes em uma freqüência de 5 a 10% e 70-80% destes nucleotídeos estão metilados e localizados em regiões não codificadoras. Durante a evolução, os dinucleotídeos CpG foram progressivamente eliminados do genoma dos eucariotos superiores. Este fenômeno, denominado supressão CpG, pode ser explicado pela alta taxa de mutação da citosina metilada, que é transformada em timina por processo de deaminação (BIRD, 1995; SINGAL; GINDER, 1999; TOYOTA; ISSA, 1999; VERMA; SRIVASTAVA, 2002). Segundo Jones (2003), aproximadamente 80% dos sítios CpG em humanos tem sido perdidos desta forma.

No entanto, em contraste com o resto do genoma, têm-se preservado pequenas extensões de 0.5 a 5 kb ricas em CpG e que são denominadas de ilhas CpG. O conceito mais aceito para ilha CpG é que ela seja maior que 200 pares de bases, possuem um alto conteúdo CG (60–70 %) e uma taxa de observado/esperado para a ocorrência de CpG  $> 0.6$  (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987; LI; DAHIYA, 2002; STRATHDEE; BROWN, 2002). Estima-se que existam no genoma humano em torno de 45 mil ilhas de CpG, que estão localizadas nas regiões promotoras e nos primeiros éxons de aproximadamente 60% dos genes (COSTELLO; PLASS, 2001; NEPHEW; HUANG, 2003). CpGs dentro das ilhas CpG são normalmente não metiladas enquanto que a maioria das CpG fora das ilhas são metiladas (Figura1A).

Durante a tumorigênese, os dinucleotídeos CpGs localizados fora das ilhas CpG tornam-se hipometilados, enquanto as ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras dos genes supressores de tumor, tornam-se hipermetiladas. Esta hipermetilação é associada com condensação da cromatina e repressão transcricional (Figura1B) (COTTRELL, 2004; ESTELLER, 2005a).



**Figura 1.** (A) A maioria dos CpGs apresentam-se normalmente metilados no estado celular normal, enquanto que CpGs dentro de ilhas CpG apresentam-se não metiladas. (B) Durante a tumorigênese, CpGs fora das ilhas tornam-se hipometilados e dentro das ilhas tornam-se hipermetilados (COTTRELL, 2004).

### 2.3 Papel da Metilação na Célula Normal

A metilação é um importante meio de regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário (KAFRI *et al.*, 1992), um processo que envolve a ativação e desativação seqüencial de diferentes classes de genes (MOMPARLER; BOVENZI, 2000). Segundo Jaenisch e Bird (2003), durante o desenvolvimento dos mamíferos ocorre uma onda de demetilação durante a clivagem, seguida por metilação *de novo* após a implantação. Processos como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico também estão envolvidos na metilação do DNA, em que o alelo não expresso apresenta a sua região promotora metilada (MOMPARLER; BOVENZI, 2000; STRATHDEE; BROWN, 2002).

Um outro papel biológico da metilação do DNA em células normais é a repressão dos transposons, retrovírus e alguns elementos repetitivos, limitando assim a propagação destes elementos pelo genoma. Estas seqüências parasitárias podem ser controladas por repressão transcricional mediada por muitas proteínas hospedeiras, mas é possível que a principal linha de defesa contra a expressão destas seqüências seja a inativação através da metilação dos seus promotores (ESTELLER, 2003).

### 2.4 Papel da Metilação no Câncer

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos, caracterizado pela ocorrência ou acúmulo de alterações genéticas, cromossômicas e alterações epigenéticas (COTTRELL, 2004; ESTELLER, 2000; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005). São várias as maneiras pelas quais a epigenética age na carcinogênese:

- Alterações genéticas: o padrão de metilação pode afetar indiretamente a atividade gênica, através de transtornos no processo transcrição-tradução, devido ao aumento da possibilidade de mutações pontuais, resultando em instabilidade cromossômica. Isso ocorreria porque na citosina metilada há uma grande possibilidade de ocorrer uma

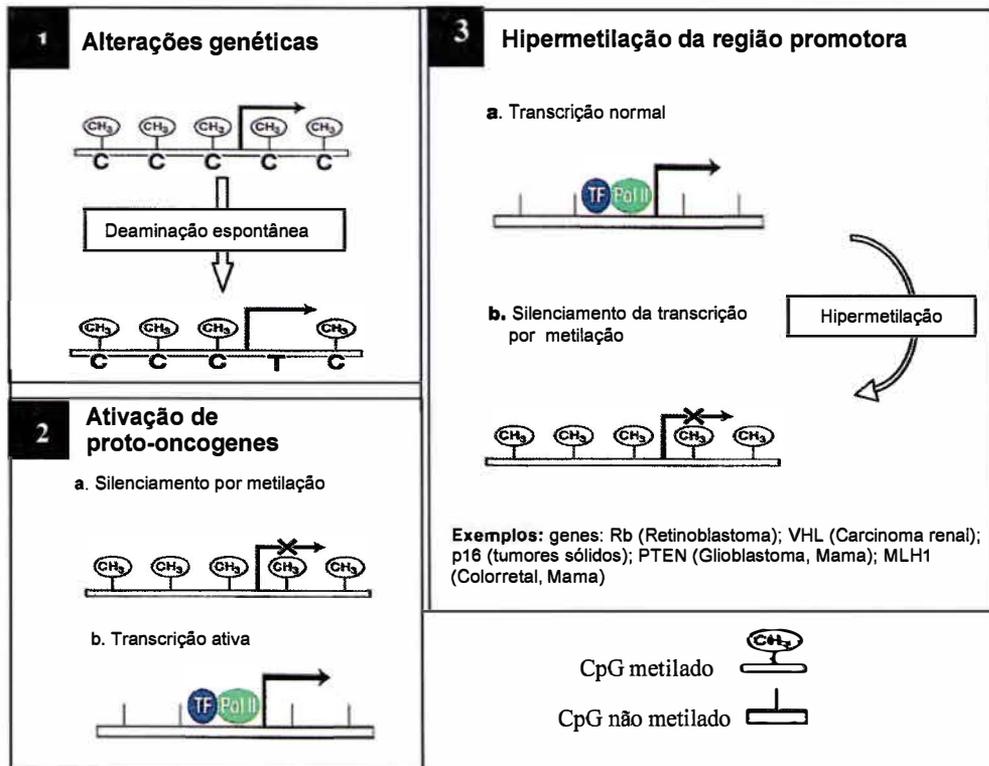
deaminação espontânea, o que resultaria na formação da base nitrogenada timina. Esse tipo de mutação pode alterar a função dos produtos dos oncogenes ou dos genes supressores de tumor (Figura 2.1) (SINGAL; GINDER, 1999; WAJED; LAIRD; DEMEESTER, 2001).

- Hipometilação global: contribui para a carcinogênese por ser responsável pela reativação dos elementos transponíveis e retrovírus e pela perda do *imprinting* (ESTELLER; HERMAN, 2002; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005). Acredita-se também que a hipometilação seja fonte de instabilidade cromossômica, modificando a expressão dos proto-oncogenes, transformando-os em oncogenes (Figura 2.2) (SINGAL; GINDER, 1999).
- Metilação exagerada nas ilhas CpG: nas células normais o padrão de metilação do DNA conserva-se ao longo dos ciclos de divisão celular, permitindo a expressão de um conjunto particular de genes necessários à atividade normal da célula (ESTELLER, 2000). No câncer, várias ilhas CpG tornam-se hipermetiladas, diminuindo a expressão do gene (ESTELLER, 2005b; ESTELLER *et al.*, 2001; SINGAL; GINDER, 1999). Exemplos de genes inativados por este mecanismo incluem: genes supressores de tumor (p16 INK4a, p14ARF, p15 INK4b, P73, p53, Rb, VHL), genes da via apoptótica (DARK), genes do mecanismo de reparo do DNA (MLH1, MGMT), genes inibidores de metástases (E-caderina) (Figura 2.3) (ESTELLER, 2000).

Além da hipermetilação observada nos tumores malignos, tem-se observado que o padrão de metilação tenderia a aumentar com o envelhecimento, o que poderia elevar a predisposição individual ao câncer (HOLLIDAY, 2005).

- Desregulação das enzimas metiltransferases: é provável que a hipermetilação aberrante dos promotores seja devida à infidelidade da DNMT1. DNMT1 faz parte de um complexo multiprotéico de replicação do DNA, o qual pode ser passível de erros. Não são

conhecidos ainda os mecanismos que controlam a especificidade das outras DNA metilases, que metilam o DNA *de novo*, as DNMT3a e 3b, mas se elas metilarem a seqüência CpG errada, elas poderão contribuir para uma metilação aberrante do DNA (MOMPARLER, 2003).



**Figura 2.** Diferentes mecanismos pelos quais a metilação do DNA pode promover a oncogênese (Singal e Ginder, 1999).

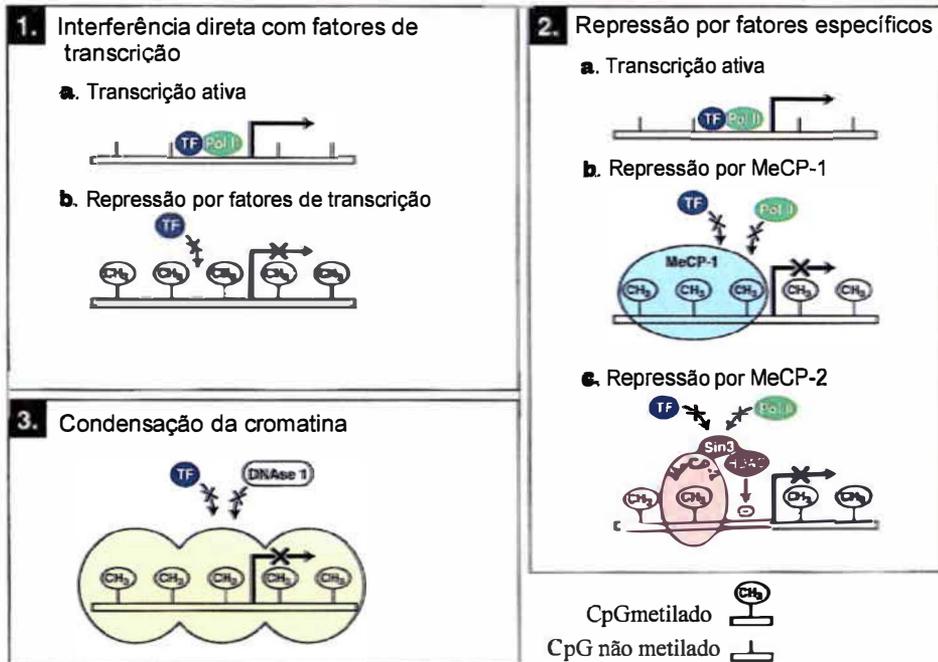
## 2.5 Remodelamento da Cromatina

Os mecanismos de remodelagem da cromatina desempenham um papel essencial no controle da expressão gênica em humanos. As histonas, maior componente da cromatina, podem ser acetiladas e desacetiladas pelas histonas acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs), respectivamente. A acetilação/desacetilação das histonas é um importante mecanismo de regulação transcricional (BAYLIN; HERMAN, 2000; ESTELLER, 2005a; ESTELLER; HERMAN, 2002; LYKO; BROWN, 2005; SINGAL; GINDER, 1999). Também estão envolvidos

neste complexo outras proteínas de repressão transcricional (*methyl cytosine binding proteins 1 e 2* ou MeCP1 e MeCP2 e *methyl binding proteins* ou MBDs) (COSTELLO; PLASS, 2001; ESTELLER, 2005c; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005; SINGAL; GINDER, 1999; WAJED; LAIRD; DEMEESTER, 2001).

O modelo proposto, pelo qual a metilação do DNA conduz à repressão transcricional em células cancerosas, é descrito da seguinte forma: 1) a metilação dos resíduos de citosina no DNA pode interferir diretamente na ligação de fatores de transcrição aos seus locais de reconhecimento na região promotora (Figura 3.1); 2) recrutamento das proteínas, tais como as MBDs e MeCp1 e 2, que além de competirem com os fatores transcricionais poderiam atrair complexos protéicos como as histonas desacetilases (HDACs), enzimas responsáveis pela remoção de um grupo acetil das histonas, promovendo assim, uma compactação da cromatina (Figura 3.2). Essa condensação da cromatina faz com que o DNA fique menos acessível aos fatores de transcrição. Portanto, o fechamento da cromatina requer a remoção dos grupos acetil das histonas (Figura 3.3) (COSTELLO; PLASS, 2001; ROBERTI; SALA; CINTI, 2005; SINGAL; GINDER, 1999).

Segundo Nephew e Huang (2003) modificações das histonas são eventos primários no silenciamento gênico, enquanto que a hipermetilação das ilhas CpG são consideradas eventos subsequentes, estabelecendo um estado permanente de inativação do gene.



**Figura 3.** Mecanismo proposto pelo qual a metilação do DNA reprime a transcrição do gene (Singal e Ginger, 1999).

## 2.6 Aplicações Clínicas e Terapêuticas no Estudo da Metilação

De acordo com Esteller (2003), (1) a metilação das ilhas CpG é um fator significativo no diagnóstico precoce do câncer, podendo ser detectado em amostras biológicas como o soro e a urina; (2) produtos dos genes que são silenciados por metilação do DNA podem ser usados como biomarcadores de resposta a quimioterápicos ou terapia hormonal; (3) genes que são inativados por metilação podem ser usados como um fator prognóstico; (4) genes metilados podem ser reativados por agentes demetiladores.

Ao contrário de uma modificação genética, uma mudança epigenética pode ser mais facilmente desfeita farmacologicamente (LAIRD, 2005). Por esta razão, tem despertado interesse na possibilidade de reativação de genes silenciados, epigeneticamente, em câncer. As drogas mais conhecidas são 5-azacitidina (5-aza-CR) e a 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-CdR), ambas

potentes inibidoras da metilação do DNA, que têm sido utilizadas em testes clínicos, com alguns resultados terapêuticos (MOMPARLER; AYOUB, 2001; ZHU; OTTERSON, 2003).

Porém, esses agentes químicos não têm ação específica, ou seja, acabam demetilando genes que deveriam permanecer silenciados, o que provoca conseqüências importantes no indivíduo. Um outro problema é que, em altas doses, estes agentes parecem ter efeitos tóxicos em células normais. Uma das grandes expectativas do futuro é a elaboração de medicamentos mais seletivos, capazes de reverter somente os processos de metilação responsáveis por doenças (EGGER *et al.*, 2004; MURGO, 2005).

### **3. CÂNCER DE MAMA**

O câncer é a segunda causa de morte por doença no mundo e demanda a realização de ações com variados graus de complexidade. No Brasil, o câncer de mama constitui a primeira causa de morte, por câncer, entre as mulheres, registrando-se uma variação percentual relativa de mais de 80 % em pouco mais de duas décadas: a taxa de mortalidade padronizada por idade, por 100.000 mulheres, aumentou de 5,77 em 1979, para 9,74 em 2000, sendo que o número de casos novos esperados para o Brasil em 2006 é de 48.930, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. No Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um retardamento no diagnóstico e na instituição de terapêutica adequada (INCA, 2005).

#### **3.1 Fatores Associados ao Câncer de Mama**

Ao que tudo indica, o câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com o estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente (JOHNSON-THOMPSON; GUTHRIE, 2000). Todos os cânceres de mama têm origem genética. Acredita-se que 90%-95% deles sejam esporádicos (não-familiares) e decorrem de mutações somáticas que se verificam durante a vida

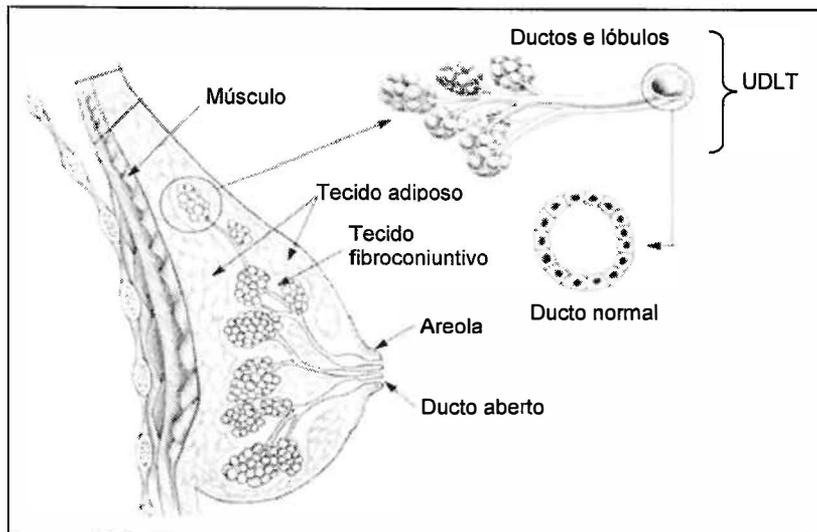
e que 5%-10% sejam hereditários (familiares), devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres suscetibilidade ao câncer de mama (BILIMORIA; MORROW, 1995).

Os principais fatores associados a um risco aumentado de desenvolver câncer de mama são: sexo feminino, menarca precoce (antes dos 11 anos), menopausa tardia (instalada após 55 anos de idade), ocorrência da primeira gravidez após 30 anos e nuliparidade. A ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para câncer de mama, assim como a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos. A história familiar é um importante fator de risco para o câncer de mama, especialmente se mãe e irmã foram acometidas na pré-menopausa; ou aquela que teve diagnóstico prévio de hiperplasia atípica ou neoplasia lobular *in situ*; ou ainda câncer de mama prévio. A idade constitui um outro importante fator de risco, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade (INCA, 2005).

### 3.2 Glândula mamária

O epitélio mamário normal forma uma pequena parte do tecido mamário total; a maioria das doenças que afeta a mama é proveniente do epitélio. O epitélio está arranjado com 10 a 15 segmentos, formando uma estrutura ramificada semelhante a uma árvore. Os lóbulos (um agrupamento de ácinos revestidos de epitélio) drenam para os ductos, os quais drenam para os ductos coletores que se abrem na superfície do mamilo. O lóbulo e os seus ductos terminais são chamados de unidade ducto-lobular terminal (UDLT) e muitas lesões patológicas se iniciam nessa área (Figura 4). As características de diferenciação para células do revestimento ductal ou células do componente acinar (lobular) ficam presentes, mesmo nas células com transformação neoplásica e dão origem aos carcinomas ductais e lobulares (e seus subtipos), respectivamente. O epitélio fora do sistema de ductos é constituído por duas camadas, uma camada interna de

epitélio e uma camada externa de mioepitélio. Essa bicamada celular é um dos principais guias usados para distinguir lesões benignas de malignas. Os ductos são sustentados por fibras elásticas presentes no estroma da mama, que consiste de tecido fibroconjuntivo denso misturado com tecido adiposo (COTRAN *et al*, 2000).



**Figura 4.** Estrutura da glândula mamária ([www.cancervic.org.au/cancer1/prevent/breasthealth.htm](http://www.cancervic.org.au/cancer1/prevent/breasthealth.htm)).

O desenvolvimento da mama e a proliferação celular durante o ciclo menstrual são regulados por hormônios esteróides, como o estrógeno e a progesterona, ativando a via dos seus receptores correspondentes (RE, RPg) (BECKMANN *et al.*, 1997). Estrógenos são necessários para o crescimento e sobrevivência do epitélio mamário e cerca de 30% dos carcinomas da mama mantêm esta hormônio-dependência. Efeitos estrogênicos são mediados pela ligação do hormônio a fatores transcricionais, os receptores de estrógeno (RE). Estes receptores são proteínas que dimerizam e se ligam a seqüências no DNA, denominadas elementos responsivos ao estrógeno (ERE), na região promotora de genes-alvo, aumentando a transcrição destes genes, os quais incluem o receptor de progesterona e o inibidor de apoptose bcl-2, bem como o receptor de fator de crescimento epitelial e alguns fatores de crescimento e proto-oncogenes (myc, fos, jun) (HALBE *et al*, 2000; (RUSSO; RUSSO, 2004). A presença e concentração do RE

e RPg são usadas como marcadores prognósticos e de sobrevivência (BECKMANN *et al.*, 1997; MANSOUR; RAVDIN; DRESSLER, 1994; MCGUIRE *et al.*, 1992).

### 3.3 Patologia

A progressão do tumor é freqüentemente descrita como uma seqüência linear de lesões que podem ser reconhecidas morfológicamente (SUBRAMANIAN; AXELROD, 2001). As lesões benignas podem ser não proliferativas e proliferativas. As lesões não proliferativas incluem os cistos, metaplasia apócrina e hiperplasias epiteliais de categoria discreta e moderada. As lesões proliferativas podem ser subdivididas em lesões proliferativas sem atipias (que incluem papilomas isolados, adenoses esclerosantes, fibroadenomas, hiperplasias ductais intensas ou floridas de tipo usual) e com atipia. As hiperplasias atípicas são definidas como proliferações semelhantes às hiperplasias comuns, exibindo, em concomitância, alguns achados dos carcinomas *in situ*. As hiperplasias atípicas são subdivididas em tipos lobular e ductal. O risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com hiperplasia ductal atípica e hiperplasia lobular atípica é aproximadamente igual em ambas as mamas (DUPONT; PAGE, 1985; JENSEN *et al.*, 1989; VOGEL, 2004). As lesões proliferativas mamárias benignas são consideradas precursoras do câncer de mama. Análises de CGH mostraram o ganho de 20q13 em 80% das hiperplasias ductais; essa alteração é considerada inicial na tumorigênese. O mesmo ocorre para ampliações em 8q24; ambas as alterações também foram observadas em carcinoma ductal *in situ* (BOECKER *et al.*, 2001). Aproximadamente 40% das mulheres com história familiar de câncer de mama e hiperplasia atípica subseqüentemente desenvolvem câncer de mama (VOGEL, 2004).

O câncer de mama pode ser classificado histologicamente com base em tipos e padrões de células que o compõe. Carcinomas podem ser invasivos (invadem o estroma mamário) ou não invasivos (confinados aos ductos e lóbulos).

### Carcinoma in situ (CDIS)

O termo carcinoma *in situ* (ou carcinoma intraductal) engloba um grupo heterogêneo de lesões. São caracterizadas por proliferações de células, com características ductais, no interior do sistema ducto-lobular da mama, sem evidências microscópicas de invasão no estroma circunjacente (BECKMANN *et al.*, 1997; SUBRAMANIAN; AXELROD, 2001).

O carcinoma *in situ* pode ser ductal (CDIS) e lobular (CLIS). Os CDIS são geralmente considerados como precursores de carcinomas invasivos (SUBRAMANIAN; AXELROD, 2001).

### Carcinomas Invasivos

A maioria dos carcinomas invasivos é do tipo ductal (85-95%). Os subtipos de carcinomas ductais da mama apresentam fatores característicos e particulares (KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004). Os carcinomas lobulares, que correspondem a cerca de 10 a 15% dos cânceres de mama, apresentam altas taxas de bilateralidade e multicentricidade (FRANCIS *et al.*, 2001).

Os outros tipos histológicos são: tubular, medular, mucinoso, papilar, metaplásico, apócrino, adenóide cístico, escamoso, secretor e inflamatório. De todos esses tipos histológicos, o carcinoma inflamatório é o que apresenta pior prognóstico (BECKMANN *et al.*, 1997).

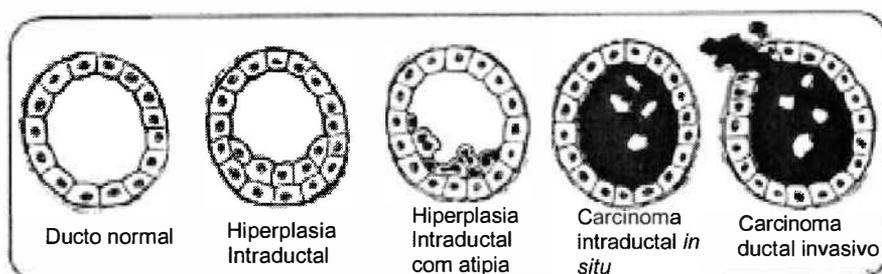
## **3.4 Processo Carcinogênico**

Estudos clínicos e experimentais apóiam um modelo de desenvolvimento do câncer de mama em que uma série de mutações acumuladas contribui para o processo de carcinogênese (BOONE; KELLOFF; FREEDMAN, 1993; KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004; TLSTY *et al.*, 2004). O perfil particular das mudanças genéticas em cada tumor é responsável pela heterogeneidade no comportamento tumoral e pelas diferentes respostas ao tratamento, observadas em cada paciente. Uma série de alterações genéticas iniciais, ainda não bem

definidas no epitélio da mama, contribui para o desenvolvimento de lesões pré-malignas associadas ao aumento do risco de câncer de mama, que aumenta duas vezes nas hiperplasias e até 10 vezes no carcinoma *in situ* (DUPONT *et al.*, 1993).

A biologia do câncer de mama permanece insuficientemente compreendida. Embora a classe histológica, expressão de esteróides e receptores para fator de crescimento, proto-oncogenes como o ERBB2 e mutações no gene TP53 terem sido correlacionados para o prognóstico, o conhecimento sobre o prognóstico individual fornece informações limitadas sobre a biologia dessa doença. A heterogeneidade celular e molecular dos cânceres de mama e um grande número de genes potencialmente envolvidos no controle de crescimento celular, morte e diferenciação enfatizam a importância de estudar as múltiplas alterações genéticas do câncer (SORLIE *et al.*, 2001). Acredita-se que o câncer de mama, como a maioria dos outros cânceres, tem origem em uma célula que, por inúmeros eventos diferentes, torna-se maligna (BECKMANN *et al.*, 1997).

Um modelo comum para a tumorigênese mamária propõe que o epitélio normal se torne proliferativo (hiperplasia) e depois, através de um acúmulo de anormalidades moleculares, se desenvolva em carcinoma: inicialmente em carcinoma ductal *in situ*, seguido por carcinoma ductal invasivo (figura 5) (KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004; LAKHANI *et al.*, 2002; TLSTY *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Modelo de progressão do câncer de mama (TISTY *et al.*, 2004).

Segundo alguns autores, a visão tradicionalista da progressão do câncer de mama como uma seqüência linear tem sido reavaliada por evidências morfológicas e moleculares. Lesões pré-invasivas e invasivas podem ocorrer juntas em muitos tipos de tumores de mama. Geralmente, os estágios mais avançados apresentam várias mudanças genômicas e, em parte por causa disso, o carcinoma ductal *in situ* é considerado como um precursor de carcinoma invasivo. Entretanto, nem todas as mudanças genéticas encontradas nos estágios precoces são vistas também nos estágios mais avançados do câncer. Estes resultados sugerem que o carcinoma ductal *in situ* possa não ser um precursor direto do carcinoma invasivo, pelo menos, não como descrito pelo modelo linear da tumorigênese do câncer de mama (GUPTA *et al.*, 1997; MORIYA; SILVERBERG, 1994; SUBRAMANIAN; AXELROD, 2001; TSUDA; HIROHASHI, 1998).

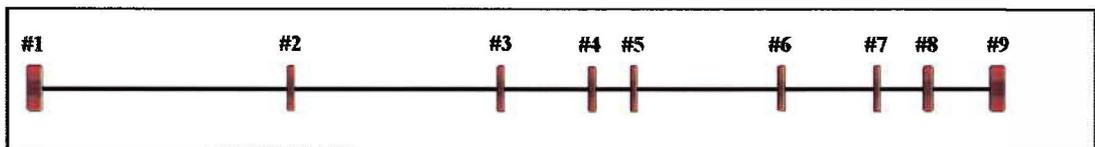
Alterações no padrão de metilação podem estar envolvidas no processo de formação de tumoral (BALLESTAR; ESTELLER, 2005); por exemplo, a hipermetilação de genes de supressão tumoral leva a uma menor expressão destes genes e conseqüente perda de função, como no câncer de mama, onde está bem demonstrada a hipermetilação do gene *BRCA1* (ROBERTSON; JONES, 2000) enquanto que hipometilação de oncogenes leva a uma maior expressão, com conseqüente ganho de função (NEWELL-PRICE; KING; CLARK, 2001).

#### **4. GENE SUPRESSOR DE TUMOR PTEN**

À medida que os tumores progredem para um estágio mais avançado, adquirem um número crescente de alterações genéticas. Li *et al.* (1997) notaram que a perda da heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q23 ocorria em alta freqüência em uma variedade de tumores humanos; este padrão de LOH sugeriu que 10q23 codifica um gene supressor de tumor. Pelo mapeamento de deleções homozigóticas nesta região, eles isolaram um candidato a gene supressor de tumor que foi denominado PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on*

*Chromosome Ten*). O mesmo gene foi isolado independentemente por Steck *et al.* (1997) e foi chamado de MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancers-1*). Outro grupo também o identificou e o designou de TEP-1 (*transforming growth factor [TGF1] - regulated and epithelial cell-enriched phosphatase*) (LI; SUN, 1997).

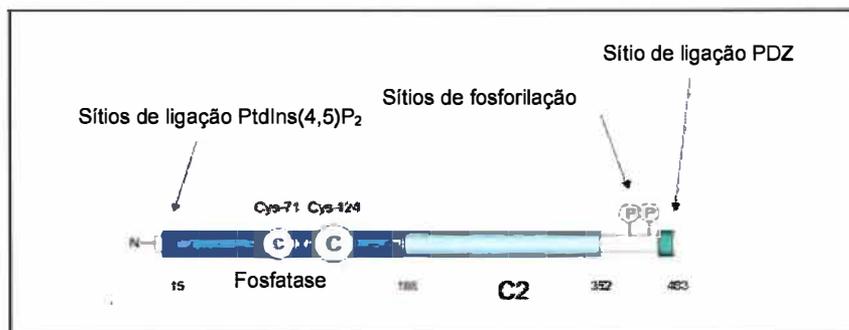
Análises seqüenciais revelaram que o gene PTEN contém nove éxons (figura 6), codifica uma proteína com 403 aminoácidos que contém um domínio tirosina fosfatase e uma região homóloga a proteínas do citoesqueleto (aproximadamente 175 aminoácidos), a tensina e a auxilina (LI *et al.*, 1997).



**Figura 6.** Distribuição genômica dos nove éxons (#) do gene PTEN (LI *et al.*, 1997).

O estudo para determinar a estrutura cristalina da proteína do gene PTEN revelou que o domínio N-terminal está associado ao domínio C-terminal (LEE *et al.*, 1999). Estes dois domínios juntos formam a unidade catalítica e compreendem quase a proteína inteira, excluindo somente uma região muito curta do N-terminal e uma região de 50 aminoácidos no C-terminal (figura 7) (LEE *et al.*, 1999; LESLIE; DOWNES, 2004; VAZQUEZ *et al.*, 2000). No domínio C-terminal ocorrem aproximadamente 43% das mutações de PTEN e ele contém subdomínios importantes: primeiro, um domínio C2 (aminoácidos de 186-352), que é associado com regiões de ligações fosfolipídicas (RIZO; SUDHOF, 1998). Outra característica é a presença de um sítio de ligação PDZ, o qual interage fortemente com o domínio fosfatase e compreende uma região de interação proteína-proteína. A eliminação de PDZ reduz a capacidade da proteína PTEN de inibir o substrato de AKT (WU *et al.*, 2000), sugerindo que esta região é importante na sua atividade. Esta região C-terminal também contém vários sítios de fosforilação, localizados nos últimos 50 aminoácidos, que exercem função de estabilidade protéica; mutações ocorridas dentro desta

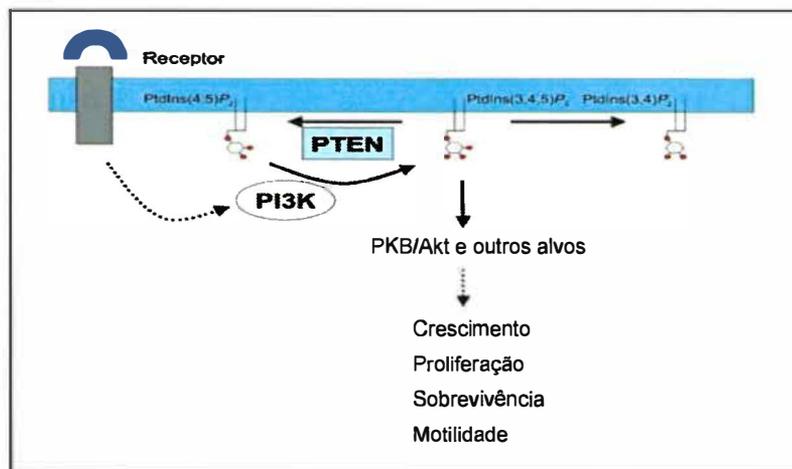
região parecem não interferir diretamente na atividade enzimática, indicando que enquanto a maioria das mutações causa a perda total da função do PTEN, mutações na região C-terminal causam somente perda parcial da sua função (LESLIE; DOWNES, 2004). A maioria das mutações ocorre no domínio N-terminal (aminoácidos de 1-186). Esta região é a parte enzimática do PTEN, isto é, seu domínio fosfatase e, embora similar a outras fosfatases da proteína, tem um local ativo ligeiramente maior. Este local é também um *hot spot* com aproximadamente 31% de mutações germinativas e somáticas que ocorrem no éxon 5 (WAITE; ENG, 2002). É de conhecimento que mutações truncadas e *frameshift* dentro do domínio catalítico fosfatase/C2 destrói a atividade fosfatase. Análises dos efeitos das mutações de ponto nos tumores também têm revelado que tais mutações eliminam em 81% ou reduzem em 10% a atividade fosfatase da proteína do PTEN (LESLIE; DOWNES, 2004).



**Figura 7.** Domínios da proteína do gene PTEN (LESLIE; DOWNES, 2004).

A proteína codificada pelo gene PTEN é um exemplo de antagonista entre oncogenes e produtos de genes de supressão tumoral. Maehama & Dixon (1998) mostraram que a proteína PTEN é uma fosfatase mais efetiva para lipídios do que para proteínas. Em condições normais, através da ativação de fatores de crescimento, a enzima PI3K (*fosfatidilinositol-3' Kinase*) é capaz de fosforilar PIP2 (*fosfolipídio fosfatidilinositol [4,5] bifosfato*) para gerar PIP3 (*fosfolipídio fosfatidilinositol [3,4,5] trifosfato*). Os produtos lipídicos da enzima PI3K são capazes de induzir a ativação da cascata de sinalizações essenciais para determinadas respostas celulares, entre elas a divisão e a migração celulares. A proteína PTEN bloqueia a ativação de AKT/PKB,

convertendo PIP3 em PIP2 (*fosfatidilinositol [4,5] bifosfato*) e assim interrompe o ciclo celular e promove a apoptose (figura 8). Inversamente, a inativação ou a perda da função da proteína PTEN pode contribuir para o desenvolvimento do tumor, resultando em níveis aumentados de PIP3, ativando o AKT/PKB; conseqüentemente, irá atuar na proliferação celular, migração, e inibição da apoptose (CHUNG; GINN-PEASE; ENG, 2005; LESLIE; DOWNES, 2004; OKAHARA *et al.*, 2004; PANIGRAHI *et al.*, 2004; SANSAL; SELLERS, 2004; SIMPSON; PARSONS, 2001).



**Figura 8.** Modelo de inibição da PI – Quinase pela ação do PTEN (LESLIE; DOWNES, 2004).

O gene PTEN foi identificado originalmente através de várias mutações em diferentes tipos de tumores esporádicos. Pela utilização de técnicas convencionais para detecção de mutações no gene PTEN foi encontrada uma frequência de mutações em glioblastomas, carcinomas endometriais, tumores da mama, de pulmão e de próstata (AN *et al.*, 2002; CHOE *et al.*, 2003; CHUNG; GINN-PEASE; ENG, 2005; DEPOWSKI; ROSENTHAL; ROSS, 2001; DREHER *et al.*, 2004; HALVORSEN; HAUKAAS; AKSLEN, 2003; KHAN *et al.*, 2004; MUTTER *et al.*, 2000; NASSIF *et al.*, 2004; OLAUSSEN *et al.*, 2003; PERREN *et al.*, 2000; SORIA *et al.*, 2002; TANIYAMA *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2002).

Um locus para a Síndrome de Cowden foi identificado na região 10q22-31. O gene PTEN está localizado exatamente nessa região e mutações neste gene foram encontradas em

pacientes portadores desta síndrome. O envolvimento do gene PTEN na oncogênese mamária humana tem sido estudado, mostrando que mutações de PTEN nas células germinativas na Síndrome de Cowden predisõem ao câncer de mama, à frequente LOH e à redução dos níveis da proteína PTEN em cânceres de mama esporádicos. Foi estimado que metade dos pacientes com a Síndrome de Cowden desenvolve câncer de mama (FREIHOFF *et al.*, 1999; LI; DAHIYA, 2002; PETROCELLI; SLINGERLAND, 2001). Segundo Chung *et al.* (2004), o gene PTEN tem um significativo papel na carcinogênese mamária como um gene supressor de tumor.

Desse modo, novos estudos, com análise mutacional do gene PTEN em câncer de mama humano, podem gerar mais esclarecimentos a respeito do papel das mutações em PTEN, que podem ser de grande valia no diagnóstico e/ou tratamento.

## 5. GENE DE REPARO DO DNA (MLH1)

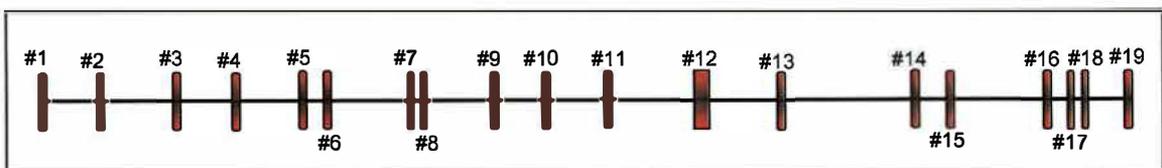
Os genes de reparo agem como controladores, mantendo a fidelidade do DNA na divisão celular, por meio de mecanismos que identificam, retiram e corrigem os erros nas seqüências de bases. O sistema *Mismatch Repair* (MMR) desenvolve um papel importante na correção de danos no DNA e sua perda pode causar desestabilização genômica que conseqüentemente pode levar a alta taxa de mutações e tumorigênese (SON *et al.*, 2004).

Muito antes de ser descoberto nos seres humanos, o sistema MMR já era estudado em organismos mais simples. Na bactéria *Escherichia coli*, três proteínas constituem o cerne do sistema: as proteínas codificadas pelos genes *mutS*, *mutL* e *mutH* (FISHEL *et al.*, 1994). Também se encontraram genes homólogos aos das bactérias em leveduras, os genes *yMSH2*, *yMLH1* e *yPMS1* (REENAN; KOLODNER, 1992). Notou-se que mutações nos genes MMR tanto das bactérias como dos fungos levavam a um fenótipo de desestabilização.

Em humanos, os primeiros a serem identificados foram genes homólogos ao *mutS* (*MSH2*, *MSH3* e *MSH6*) (FISHEL *et al.*, 1994). Papadopoulos *et al.* (1994) identificaram e

clonaram três genes adicionais do ser humano, todos relacionados ao gene bacteriano *mutL*. Um destes genes foi chamado de MLH1. Os outros dois genes apresentaram uma maior similaridade ao gene *mutL* de leveduras e foram denominados PMS1 e PMS2.

Papadopoulos *et al* (1994) identificaram o gene MLH1 no cromossomo 3p21 e Han *et al* (1995) revelaram que este gene contém 19 éxons (figura 9). O mapeamento do MLH1 foi interessante porque marcadores nesta área tinham sido ligados ao câncer colo-retal hereditário sem polipose (HNPCC) (LINDBLOM *et al.*, 1993). Procurando por mutações no MLH1, Papadopoulos *et al* (1994) realizaram análise por RT-PCR em 10 amostras de HNPCC e encontraram mutações que poderiam interromper o produto do gene, demonstrando a importância dessas mutações para a origem desta doença. Sasaki *et al.* (1996) estudaram 43 amostras de tumores de pacientes com cânceres primários múltiplos e detectaram duas mutações *missense*, que foram encontradas em regiões de microssatélites. Herman *et al* (1998) estudaram o padrão de metilação de amostras de câncer colo-retal esporádico com instabilidade de microssatélites (MSI). Os resultados sugeriram que a MSI poderia ser consequência da hipermetilação do gene MLH1.

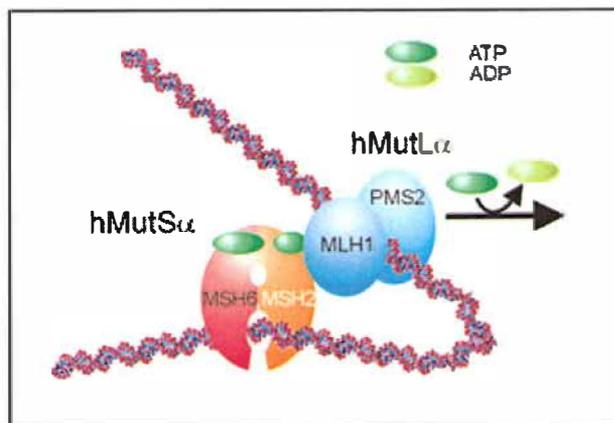


**Figura 9.** Distribuição genômica dos treze éxons ( # ) do gene MLH1 (HAN *et al.*, 1995).

Alterações genéticas e modificações epigenéticas (hipermetilação) do gene MLH1 têm sido associadas com cânceres de mama esporádicos (MURATA *et al.*, 2002). Em um estudo realizado, Benachenhou *et al* (1999) encontraram freqüentes LOH do gene MLH1 em cânceres de mama esporádicos, sugerindo que este gene poderia estar envolvido na tumorigênese mamária. MSI tem sido identificada em células de câncer de mama, sugerindo uma associação com genes MMR. A fim de testar esta hipótese, Murata *et al* (2002) investigaram MSI, a

expressão das proteínas hMLH1 e hMSH2, bem como modificações genéticas e epigenéticas destes genes. Os resultados sugeriram que estas alterações, em especial do gene MLH1, contribuem para a instabilidade genômica e tumorigênese em cânceres de mama esporádicos.

A atividade do MMR eleva a fidelidade de replicação do DNA por um fator de 100-1000 vezes através da remoção de erros deixados pelas DNA polimerases (SCHOFIELD; HSIEH, 2003). A principal função do MMR é o reconhecimento e correção de três tipos de erros: pareamento desigual de bases simples, bases quimicamente alteradas e alças na hélice. Para isto, ocorre a interação dos produtos protéicos dos genes MMR. Um primeiro heterodímero chamado de hMutS $\alpha$ , formado por proteínas do grupo de homólogos de mutS: hMSH2/hMSH6, tem sua ação principalmente nos erros de pareamento entre bases (ALANI *et al.*, 2003; SCHOFIELD; HSIEH, 2003; SELMANE *et al.*, 2003). Gradia *et al* (2000) descreveram que a troca do ADP>ATP no heterodímero hMutS $\alpha$  causa mudança conformacional do mesmo, transformando-o em uma espécie de braçadeira que corre sobre a dupla fita de DNA a ser reparada, desempenhando assim sua função. Um outro heterodímero chamado hMutL $\alpha$ , formado pelas proteínas hMLH1 e hPMS2 é formado; este complexo vai agora interagir com o complexo formado pela hMSH2/hMSH6 (Figura 10) (KUNKEL; ERIE, 2005). Mutações *missense* em regiões específicas de MLH1 podem levar a defeitos nas interações proteína-proteína com PMS2 e vice-versa (YUAN *et al.*, 2002).



**Figura 10.** Representação esquemática da atividade do sistema MMR (SELMANE *et al.*, 2003).

## **6. OBJETIVOS**

- 
- Investigar o estado mutacional do gene PTEN em tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana.
  - Fazer um estudo no estado de metilação da ilha CpG da região promotora do gene hMLH1.
  - Tentar identificar alterações que possam ser eventos críticos na gênese e na evolução dessas neoplasias.

## **7. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ●Amostra

Tecidos tumorais frescos foram obtidos através de biópsias de 40 pacientes da cidade de Ribeirão Preto, SP – Brasil entre os anos de 1999 e 2003. A média da idade das pacientes foi de 47 anos (variação entre 27 e 85 anos). Das quarenta casos, nove foram hiperplasias, três fibroadenomas e seis foram outros tipos lesões proliferativas mamárias benignas (adenose, hipertrofia, alterações fibrocísticas); os casos malignos são constituídos por cinco carcinomas ductais *in situ*, quinze carcinomas ductais infiltrantes (medular, grau I, II e III) e dois carcinomas ducto-lobulares. Os tecidos patológicos foram analisados por exame histopatológico.

### ●Aspectos Éticos

Atendendo à resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 2003), que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEPHC-FMRP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), em Brasília. O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo CEPHC-FMRP tendo o seguinte número 9566/2004.

### ●Extração do DNA

A amostra tumoral foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pulverizado. Em seguida, foi transferida para um tubo de centrifuga e acrescidos 5ml de tampão de extração (Tris 1M; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M). Adicionaram-se 50 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 0,5 ml de SDS 20%; misturou-se por inversão e incubou-se em banho-maria a 37 ° C *overnight* ou a 57° C por 3 horas. Após este tempo, adicionaram-se 3 a 5ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se por inversão suave durante 5 minutos e centrifugou-se a 3000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifuga e foram adicionados 3 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1); homogeneizou-se por inversão suave durante 5 minutos e repetiu-se essa operação. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de

centrífuga, o volume da amostra foi medido e foram colocados um terço deste volume de acetato de amônio 7.5M e 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. O frasco foi invertido suavemente por diversas vezes até que ocorresse a precipitação do DNA. O mesmo foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur, lavado em etanol absoluto e ressuspendido em 100-500  $\mu$ l de água Milli-Q estéril. O DNA foi quantificado e diluído para que se obtivesse uma concentração de 50ng/ $\mu$ l.

### Análise do estado mutacional do gene PTEN

#### ● Reação em cadeia da polimerase – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Foram analisados os 9 éxons do gene PTEN. Os *primers* utilizados foram extraídos da literatura (COHN *et al.*, 2000; DAVIES *et al.*, 1999; DICUONZO *et al.*, 2001; HOLWAY *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2000; PERREN *et al.*, 2000) e alguns foram desenhados no Laboratório de Oncogenética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (tabela 1) e avaliados pelo programa *Gene Runner*. As condições de PCR para o gene PTEN estão demonstradas na tabela 2.

**Tabela 1.** Sequências senso (S) e anti-senso (AS) dos primers e seus respectivos tamanhos em pares de base (pb) e os tamanhos dos fragmentos amplificados.

EXONS	Seqüências dos <i>Primers</i>	Nº (pb)	Tamanho (pb)	Referências
1	S: TCTGCCATCTCTCTCCTCCT	20		
	AS: CCGCAGAAATGGATACAGGT	20	~ 141	Holway <i>et al.</i> , 2000
2	S: TGACCACCTTTTACTCTCCA	21		
	AS: AGTATCTTTTTCTGTGGC	18	~ 313	Liu <i>et al.</i> , 2000 <sup>1</sup>
3	S: TGTTAATGGTGGCTTTTTG	19		
	AS: GCAAGCATACAAATAAGAAAAC	22	~ 114	Dicuonzo <i>et al.</i> , 2001
4	S: CCTAAGTGCAAAGATAAC	19		
	AS: TACAGTCTATCGGGTTTA	18	~145	Dicuonzo <i>et al.</i> , 2001
5 A	S: TTCTTATTCTGAGGTTATC	19		Dicuonzo <i>et al.</i> , 2001
	AS: GCACATATCATTACACCAG	19	~188	Davies <i>et al.</i> , 1999

<b>5 B</b>	S: GCTGGAAAGGGACGAACTGG	20		LO
	AS: GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	21	~152	Dicuonzo <i>et al.</i> , 2001
<b>6</b>	S: CTTCTCTTTTTTTTCTGTCCACC			
	AS: AGCACTTACTGCAAGTTCCGCCA C	23 24	~176	LO
<b>7</b>	S: ATCGTTTTTGACAGTTTG	18		
	AS: CTCCAATGAAAGTAAAG	18	~263	Holway <i>et al.</i> , 2000 <sup>1</sup>
<b>8 A</b>	S: CAGATAACTCAGATTGCC	18		
	AS: TTTCTACTTTTTCTGAGG	18	~261	LO
<b>8 B</b>	S: CCAGGACCAGAGGAAACC	18		Cohn <i>et al.</i> , 2000
	AS: ACATCACATACATAAAGTC	20	~219	Perren <i>et al.</i> , 2000
<b>9</b>	S: GTCATATTTGTGGGTTTTTC	18		LO
	AS: GGTGTTTTATCCCTCTTG	18	~258	Dicuonzo <i>et al.</i> , 2001

1- *Primers* modificados; LO-*Primers* desenhados no Laboratório de Oncogenética.

**Tabela 2.** Condições de PCR para o gene PTEN

EXONS	DI	CR	EF
<b>1, 5B, 6, 8B</b>	95°C / 3'	95°C /30", 60°C/45", 72°C/1'30"(35X)	72°C/30'
<b>2, 9</b>	95°C / 3'	95°C/30", 53°C/45", 72°C/1'30"(35X)	72°C/30'
<b>3</b>	95°C / 3'	95°C/30", 55°C/45", 72°C/1'30"(35X)	72°C/30'
<b>4 e 7</b>	95°C / 3'	95°C/30", 50°C/45", 72°C/1'30"(35X)	72°C/30'
<b>5ª e 8ª</b>	95°C / 3'	95°C/30", 48°C/45", 72°C/1'30"(35X)	72°C/30'

DI - denaturação inicial; CR - ciclo da reação, EF - extensão final correspondendo respectivamente às seguintes fases da reação: denaturação, anelamento e fase de extensão.

Para a reação de PCR foi preparada uma mistura contendo cerca de 50ng de DNA genômico, 50 pmol de cada *primer* (cada mistura com um *primer* específico), tampão da Taq polimerase (concentração final de Tris-HCl 10 mM, pH 8.4, KCl 50 mM) e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 50µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado e 1,25 unidades da Taq polimerase. As ampliações foram realizadas com ciclador térmico PTC-100 (MJ Research, INC). A técnica de PCR-SSCP

consiste na amplificação de seqüências específicas de DNA através da reação de polimerase em cadeia, desnaturação do fragmento amplificado através do calor e eletroforese em gel de poliacrilamida. A presença de bases alteradas no fragmento amplificado pode induzir uma mudança na conformação estrutural adquirida pela fita simples de DNA, que pode ser detectada por meio de diferenças na migração do gel de poliacrilamida não desnaturante (HAYASHI, 1991; HAYASHI; YANDELL, 1993).

#### ●Análise de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)

As amostras a serem aplicadas (produto final da PCR) foram preparadas com uma solução corante (azul de bromofenol 0,025%, xilenocianol 0,025%, EDTA 10mM e formamida 98%). Essa mistura foi então desnaturada em banho-maria a 95°C durante 5 minutos e transferida imediatamente para uma cuba com gelo. Aplicou-se o mais rapidamente possível nas valas do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida com a concentração entre 8 - 12% a partir de uma solução de acrilamida 30% (29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida) contendo glicerol 10%, tampão BTE 10x, persulfato de amônia e Temed, a 4°C, durante aproximadamente 18 horas (dependendo do tamanho do fragmento). Após a corrida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol 10 %; ácido acético glacial 0,75 %) durante um tempo mínimo de 5 minutos.e adicionou-se nitrato de prata a 10%, seguindo-se uma lavagem com água por 1 minuto. Os géis foram submetidos a um processo de revelação em meio básico (NaOH 9%; formaldeído 0,3%). Após o processo de revelação, os géis foram analisados para verificar a presença de alterações no padrão de migração das amostras.

## Avaliação do perfil de metilação do gene MLH1

### ● Técnica e Desenho dos Primers

A técnica utilizada no presente projeto foi a MSP (Methylation-specific-PCR) desenvolvida por Herman et al. (1996), tomando como base os trabalhos de Shapiro et al. (1970), Hayatsu et al. (1970) Fromer et al. (1992). No MSP, o DNA é tratado com bissulfito de sódio que possui a capacidade de agir sobre as citosinas não metiladas da molécula de DNA e transformá-las em uracilas através de uma reação simples de deaminação. As citosinas metiladas não são convertidas em uracila após o tratamento com esse reagente, assim, pode-se diferenciar entre as citosinas que possuem um agrupamento metil ligado ao carbono 5 e as citosinas que não o possuem (figura11). Após o tratamento, uma reação é realizada utilizando-se *primers* específicos para o DNA modificado.

Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *MethPrimer* (LI; DAHIYA, 2002), criado especialmente para construção de oligonucleotídeos para PCR, baseada na metilação por conversão pelo bissulfito. Foram construídos dois pares de *primers* para o gene de interesse: uma específica para o DNA metilado (construído na posição - 675 até - 521 em relação ao sítio de início da transcrição) e a outra específica para o DNA não-metilado (construído na posição - 674 até - 520 em relação ao sítio de início da transcrição) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequências dos primers usados na MSP. pb: tamanho do fragmento esperado na MSP

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	pb
MLH1 - M	TTACGGGTAAGTCGTTTTGAC	CTATACCTAATCTATCGCCGC	154
MLH1 - U	TATGGGTAAGTTGTTTTGATGT	CCTATACCTAATCTATCACCACC	



### ● Modificação do DNA por Bissulfito

Dois microgramas de DNA, diluídos em 50µl de H<sub>2</sub>O, foram usados para o tratamento com bissulfito. O DNA foi desnaturado com NaOH (2M) durante 30 min a 45°C. Trinta microlitros de hidroquinona 10mM e 520µl de bissulfito de sódio 3M (pH5) foram adicionados ao DNA desnaturado. As amostras foram incubadas a 50°C durante 16h para a modificação.

O DNA modificado foi purificado utilizando-se o kit de purificação Wizard DNA clean-up (Promega) e eluído em 50µl de H<sub>2</sub>O. Para uma completa conversão química, foi adicionado NaOH 3M em cada tubo e cada um foi incubado por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida o DNA foi precipitado em etanol, ressuspensionado e estocado a -80°C por 48h.

### ● MSP (Methylation Specific-PCR)

A reação da PCR foi realizada em um volume final de 50µl contendo 200µM de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfato), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 ng de DNA, 200pM de cada oligonucleotídeo (primer) e 0.5U AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições da PCR para amplificação do gene foram as seguintes: uma desnaturação prévia por 2 minutos a 94°C e 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 53°C por 45 segundos com uma extensão final de 5 min a 72°C.

O produto da PCR (8µl) foi aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% (com 10% glicerol), submetido à eletroforese e corado com nitrato de prata a 10%.

### ● Sequenciamento

Para o sequenciamento das amostras de interesse foi realizada uma reação de purificação do DNA, utilizando-se 5µl do produto da PCR e 2µl da enzima ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Ohio). As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e a enzima foi inativada a 80°C por 15 minutos. O produto purificado foi visualizado em gel de agarose para a confirmação de banda única. A ExoSAP-IT é uma mistura de exonuclease I e fosfatase que tem com

---

propriedade a degradação de oligonucleotídeo de fita simples e desfosforilação de desoxirribonucleotídeos.

Para a reação de sequenciamento utilizou-se 1µl do produto da PCR, 5µl do Kit de sequenciamento DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences), 1µl de primers e 3µl de H<sub>2</sub>O. Para precipitação das amostras foram utilizados 1µl de acetato de sódio (1,5 M de acetato de sódio + 259 mM de EDTA) e 40µl de etanol 100% gelado e deixado em temperatura ambiente e local escuro por 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 10000 rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 200µl de etanol 70% e o procedimento de centrifugação e descarte foi repetido. As amostras foram secadas a 60°C por 15 minutos. O sequenciador utilizado foi ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perking Elmer, Alameda, CA).

## **8. RESULTADOS**

### **Gene PTEN**

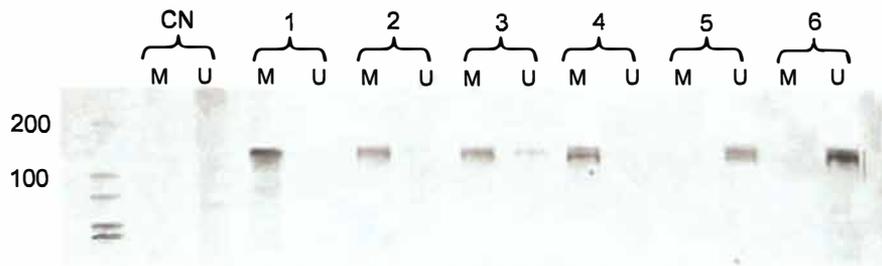
Neste trabalho foram analisadas quarenta amostras de tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana, pela técnica de PRC-SSCP e nenhuma alteração foi encontrada no gene PTEN.

### **Gene MLH1**

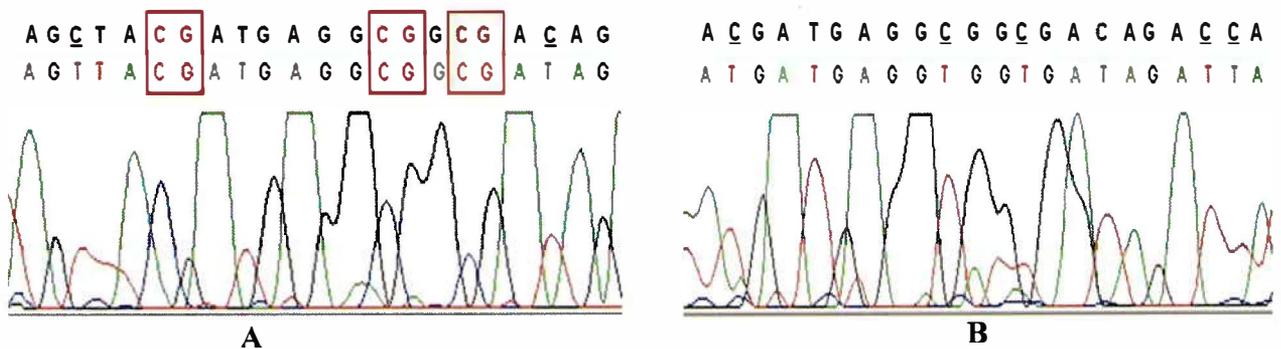
Foi analisado com sucesso o estado de metilação por MSP do gene MLH1 em trinta e quatro amostras de tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana. Foi observado que sete amostras estavam metiladas.

O grupo amostral é composto por dezesseis amostras de processos pré-neoplásicos (sete hiperplasias, três fibroadenomas e seis outros tipos lesões proliferativas) e 18 amostras de carcinomas (cinco amostras de carcinomas ductais *in situ* e treze amostras de carcinomas ductais infiltrantes). Nosso resultado apresentou metilação em quatro amostras do grupo de processos pré-neoplásico (fibroadenoma, adenose esclerosante, hiperplasia ductal simples, alteração fibrocística) e três amostras de carcinomas ductais infiltrantes (figura 12).

Como controle positivo sequenciamos uma amostra metilada (figura 13C) e uma não metilada (figura 13D) modificadas por bissulfito de sódio. Como controle negativo utilizamos uma amostra não modificada.



**Figura 12.** Gel de poliacrilamida 8% contendo reações de MSP apresentando o perfil de metilação do gene MLH1 (com 154pb), M amostras metiladas U amostras não metiladas e CN controle negativo (amostra sem tratamento). Nota-se que as amostras 1-4 encontram-se metiladas e amostras 5-6 estão na condição de não metiladas.



**Figura 13.** Resultado do sequenciamento das amostras do gene MLH1 metilada(A) e não metilada(B) usadas como controle positivo para tratamento do DNA por bissulfito de sódio, quando comparadas com a sequência não tratada.

## **9. DISCUSSÃO**

### **Análise do estado mutacional do gene PTEN**

Nas últimas décadas têm ocorrido em todo o mundo, significativo aumento da incidência do câncer de mama e conseqüentemente da mortalidade associada a essa neoplasia. O conhecimento das alterações moleculares específicas contribuindo para a patogenia do câncer da mama será crucial para a identificação de alvos específicos para novas estratégias de prevenção. Embora cada tumor apresente um perfil de mutações que lhe é característico, há certos genes que são freqüentemente alterados no câncer da mama, os quais poderiam participar do seu processo tumorigênico e da progressão maligna. Têm sido identificadas mutações no gene PTEN em pacientes com a Síndrome de Cowden e em linhagens celulares de carcinoma de mama, o que sugere que o PTEN possa está envolvido na carcinogênese mamária (FREIHOFF *et al.*, 1999).

Desde a clonagem do gene PTEN, um considerável número de trabalhos descreveu seu espectro mutacional em uma variedade de tumores humanos, tais como: glioblastomas, tumores de mama, de próstata, neoplasias endometriais e malignidades hematológicas (ALBAROSA *et al.*, 1996; ALI; SCHRIML; DEAN, 1999; CAIRNS *et al.*, 1997; DAHIA *et al.*, 1999; DAHIA *et al.*, 1997; DAVE *et al.*, 2005; KATO *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997; RASHEED *et al.*, 1995; RASHEED *et al.*, 1997; TASHIRO *et al.*, 1997; TENG *et al.*, 1997; TRYBUS *et al.*, 1996; TSOU *et al.*, 1997; WAITE; ENG, 2002; WANG *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 1999).

Mutações e deleções somáticas do gene PTEN têm sido identificadas em várias linhagens celulares e em carcinomas primários. A perda da função de PTEN parece ocorrer durante a progressão de múltiplos cânceres humanos. Chen *et al* (1999) realizaram um estudo com 52 amostras de câncer de mama utilizando PCR-SSCP e identificaram uma deleção no domínio fosfatase. Rhei *et al* (1997) detectaram 2 mutações em 54 amostras de carcinoma de mama. Lynch *et al* (1997) encontraram 5 mutações do gene PTEN nas células germinativas em 5 casos de câncer de mama familiar com Síndrome de Cowden. Marsh *et al* (1998) identificaram

mutações nas células germinativas no gene PTEN em 12 de 28 casos de síndromes hereditárias. De acordo com esses resultados e com bases obtidas no presente trabalho realizado com amostras de casos esporádicos de mama, podemos ressaltar que mutações no gene PTEN em cânceres de mama familiar são comuns. Entretanto, em câncer de mama esporádico, essas mutações constituem um evento mais raro.

Em alguns tipos de tumores, particularmente em mama, embora a mutação de PTEN seja relativamente rara, a LOH é um evento comum, ocorrendo em aproximadamente 31% dos casos. Chung *et al.* (2004) analisaram a perda da expressão em carcinoma ductal *in situ* e carcinoma invasivo, a fim de estabelecer uma correlação entre a perda da expressão da proteína PTEN e fatores prognósticos do câncer de mama. A perda da expressão não foi observada em amostras de carcinoma ductal *in situ*, porém foi observada em 32% das amostras de carcinoma invasivo.

Kurose *et al* (2002) realizaram um estudo do gene PTEN em amostras de carcinomas de mama. Cinquenta amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante para detectar o padrão de mutação. Foram encontradas 15 (30%) mutações somáticas no gene PTEN e apenas uma amostra apresentou LOH. Sugeriram então, que apenas um evento (mutação ou LOH) poderia ser suficiente para a tumorigênese.

Feilotter *et al.* (1999) analisaram a região 10q23 em cânceres de mama esporádicos. Eles combinaram a análise de SSCP para detectar o padrão de mutação, com técnicas de LOH, nesta região. Não foi encontrada mutação nestes tumores, embora a LOH tenha sido freqüente (ocorrendo aproximadamente em 36% - 38%). Esta discrepância, mostrada com uma alta incidência de LOH e/ou perda da expressão da proteína e baixas taxas de mutações, levanta a possibilidade de que mecanismos epigenéticos também possam está envolvidos na inativação do PTEN (CHUNG *et al.*, 2004; FRY, 2001; GARCIA *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2004; LESLIE; DOWNES, 2004; PETROCELLI; SLINGERLAND, 2001).

---

A perda de função do PTEN pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo mutações, LOH do locus PTEN no cromossomo 10q23 e silenciamento epigenético da expressão do PTEN. A metilação da região promotora do PTEN provoca a perda da expressão gênica (BAEZA *et al.*, 2003; LESLIE; DOWNES, 2004; SANSAL; SELLERS, 2004).

A metilação da região promotora do PTEN tem sido identificada como um mecanismo alternativo na inativação do gene supressor de tumor, mas a importância desse silenciamento no câncer de mama ainda permanece desconhecido. Em um trabalho realizado por Garcia *et al* (2004), foi investigada a metilação da região promotora de PTEN em 90 amostras de câncer mama e correlacionada com 11 parâmetros moleculares e patológicos, incluindo os níveis de mRNA. A hipermetilação nas ilhas CpG do gene PTEN foi observada em 48% das amostras analisadas; também foi visto que a hipermetilação estava associada com a superexpressão de ERBB2 e com o tamanho e classificação histológica elevada. Foi concluído que a hipermetilação do promotor do gene PTEN é um evento comum nos cânceres de mama e que a expressão de mRNA era mais baixa nos tumores com metilação aberrante.

Khan *et al.* (2004) investigaram o padrão de metilação da região promotora do gene PTEN e a expressão de sua proteína em 44 carcinomas ductais invasivos. Foi encontrada 34% de metilação aberrante, sendo que mais da metade estava associada com a perda da expressão da proteína. Das vinte e três amostras que não apresentavam sua região promotora metilada, 79% delas expressavam a proteína. Seis amostras que se apresentavam livres de metilação, também apresentavam perda da expressão da proteína, indicando que outros mecanismos possam está envolvidos na inativação da proteína. Estudos subseqüentes com animais têm sugerido que a simples perda de um alelo no gene PTEN pode ser suficiente para induzir a perda da expressão da proteína e a progressão do tumor. Curiosamente, seis das quinze amostras que apresentavam hipermetilação na região promotora do gene PTEN também expressavam a sua proteína. Foi sugerido que isto se deve a uma metilação incompleta da

região promotora; assim, talvez as células do tumor devam alcançar certo nível de metilação para a inativação transcricional, o que poderia explicar a presença de bandas metiladas com bandas não metiladas.

Em nosso trabalho, não encontramos nenhuma alteração nas amostras estudadas, o que vem concordar com a literatura, visto que mutações do gene PTEN em carcinomas da mama esporádicos são relativamente raras. Este fato mostra a importância da análise de metilação das regiões promotoras do gene, que já foram descritas por diversos autores como sendo um mecanismo pelo qual PTEN pode ser inativado. Dessa forma, análises de metilação serão o passo seguinte a este trabalho.

#### **Avaliação do perfil de metilação do gene MLH1**

A hipermetilação das ilhas CpG das regiões promotoras tem sido bastante caracterizada nos últimos anos como uma importante mudança epigenética que ocorre em todos os tipos de neoplasias humanas e está associada com o silenciamento transcricional dos genes (JONES, 2003). Segundo Murata *et al* (2005) o sistema MMR, particularmente o gene MLH1, é associado com uma variedade de cânceres, incluindo o câncer de mama esporádico. A hipermetilação do gene de reparo MLH1 ocorre em estágios iniciais da progressão tumoral e seu silenciamento resulta em MSI (BAYLIN; HERMAN, 2000).

Murata *et al* (2002) relataram que a transcrição do gene MLH1 é predominantemente inibida pela hipermetilação de sua região promotora, enquanto que a inativação do gene MSH2 é causada mais frequentemente por mutação. Nesse trabalho, Murata *et al.* investigaram MSI, expressão das proteínas dos genes MLH1 e MSH2, como também modificações genéticas e epigenéticas desses genes em 32 casos de tumores de mama esporádicos. Análises imunohistoquímicas revelaram que todos os casos que apresentaram MSI, tiveram uma diminuição da expressão das proteínas dos genes MLH1 e MSH2, sendo que oito

casos exibiram mutações ou polimorfismo nestes genes e 10 casos apresentaram hipermetilação da região promotora do MLH1. Foi sugerido que alterações epigenéticas, especialmente no gene MLH1, contribuem para a instabilidade genômica e tumorigênese em cânceres de mama esporádicos.

Os nossos resultados mostraram que 7 em 34 das amostras de tumores e processos pré-neoplásicos da mama humana estavam metiladas para o gene MLH1.

Roa *et al* (2004) estudaram o gene MLH1 em um grupo de 70 amostras de tumores mamários e verificaram que 11,4% apresentavam-se metilados. Murata *et al* (2005) analisaram o padrão de metilação pela técnica de PCR-MSP em 30 amostras de tumores da mama e detectaram metilação aberrante em 9 casos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos em nosso trabalho, onde foram encontradas 3 amostras metiladas dentre 18 carcinomas ductais infiltrantes, sugerindo que a perda da função por inativação epigenética no gene MLH1, parece ter um importante papel na progressão do câncer de mama esporádico.

Esteller *et al* (1998, 1999, 2000, 2001) demonstraram que a hipermetilação do gene MLH1 é encontrada em lesões precursoras de tumores uterinos e colo-retais. Apesar de não existirem muitos dados na literatura em relação à metilação em processos benignos mamários, encontramos em nosso trabalho, a metilação aberrante do gene MLH1 em 4 de 16 amostras de lesões benignas. Deste modo, esses resultados sugerem que a hipermetilação, além de participar da progressão, pode também estar envolvida na gênese do câncer de mama.

É certo que a metilação aberrante do gene MLH1 é frequentemente associada com a diminuição da expressão de sua proteína, fato que demonstra a importância desses estudos, através dos quais, futuramente poderão ser desenvolvidos agentes demetilantes utilizados na terapia gênica contra o câncer de mama (MURATA *et al.*, 2005).

## **10. CONCLUSÃO**

### **Gene PTEN**

De acordo com a literatura, o gene PTEN tem um significativo papel na carcinogênese mamarária como um gene supresor de tumor, pois inúmeros trabalhos têm demonstrado a perda da proteína do gene PTEN e uma alta incidência de LOH nos tumores de mama. Foi realizada uma triagem de alterações conformacionais dos 9 éxons do gene PTEN. Pela técnica de PCR os éxons foram amplificados e posteriormente analisados por SSCP, porém não foram encontradas alterações no padrão de migração. Com base neste resultado e dados obtidos na literatura, podemos sugerir que mutações no gene PTEN não representam pontos críticos para a gênese e evolução no câncer de mama esporádico.

### **Gene MLH1**

De acordo com a literatura, a inativação epigenética é considerada como um mecanismo primário na perda da expressão gênica durante a tumorigênese e a densidade da metilação dos sítios CpG aumenta em estágios mais avançados do câncer. Em nosso grupo amostral encontramos metilação da região promotora do gene MLH1 em neoplasias malignas e benignas da mama. Deste modo, estudos da expressão da proteína associados ao padrão de metilação do gene MLH1 deverão ser realizados a fim de gerar mais esclarecimentos acerca do comprometimento do MLH1 na gênese e evolução do câncer de mama.

## **11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALANI, E.; LEE, J. Y.; SCHOFIELD, M. J.; KIJAS, A. W.; HSIEH, P.; YANG, W. Crystal structure and biochemical analysis of the MutS.ADP.beryllium fluoride complex suggests a conserved mechanism for ATP interactions in mismatch repair. **J Biol Chem**, v.278, n.18, p.16088-94, May 2. 2003.

ALBAROSA, R.; COLOMBO, B. M.; ROZ, L.; MAGNANI, I.; POLLO, B.; CIRENEI, N.; GIANI, C.; CONTI, A. M.; DIDONATO, S.; FINOCCHIARO, G. Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. **Am J Hum Genet**, v.58, n.6, p.1260-7, Jun. 1996.

ALI, I. U.; SCHRIML, L. M.; DEAN, M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. **J Natl Cancer Inst**, v.91, n.22, p.1922-32, Nov 17. 1999.

AN, H. J.; LEE, Y. H.; CHO, N. H.; SHIM, J. Y.; KIM, J. Y.; LEE, C.; KIM, S. J. Alteration of PTEN expression in endometrial carcinoma is associated with down-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27. **Histopathology**, v.41, n.5, p.437-45, Nov. 2002.

BAEZA, N.; WELLER, M.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. **Acta Neuropathol (Berl)**, v.106, n.5, p.479-85, Nov. 2003.

BALLESTAR, E.; ESTELLER, M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. **Biochem Cell Biol**, v.83, n.3, p.374-84, Jun. 2005.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet**, v.16, n.4, p.168-74, Apr. 2000.

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNURCH, H. G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J Mol Med**, v.75, n.6, p.429-39, Jun. 1997.

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**, v.79, n.7-8, p.1012-7, Mar. 1999.

BILIMORIA, M. M.; MORROW, M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. **CA Cancer J Clin**, v.45, n.5, p.263-78, Sep-Oct. 1995.

BIRD, A. P. Gene number, noise reduction and biological complexity. **Trends Genet**, v.11, n.3, p.94-100, Mar. 1995.

BOECKER, W.; BUERGER, H.; SCHMITZ, K.; ELLIS, I. A.; VAN DIEST, P. J.; SINN, H. P.; GERADTS, J.; DIALLO, R.; POREMBA, C.; HERBST, H. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. **J Pathol**, v.195, n.4, p.415-21, Nov. 2001.

BOONE, C. W.; KELLOFF, G. J.; FREEDMAN, L. S. Intraepithelial and postinvasive neoplasia as a stochastic continuum of clonal evolution, and its relationship to mechanisms of chemopreventive drug action. **J Cell Biochem Suppl**, v.17G, p.14-25. 1993.

BROWN, M. A. Tumor suppressor genes and human cancer. **Adv Genet**, v.36, p.45-135. 1997.

CAIRNS, P.; OKAMI, K.; HALACHMI, S.; HALACHMI, N.; ESTELLER, M.; HERMAN, J. G.; JEN, J.; ISAACS, W. B.; BOVA, G. S.; SIDRANSKY, D. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. **Cancer Res**, v.57, n.22, p.4997-5000, Nov 15. 1997.

CHEN, S. T.; YU, S. Y.; TSAI, M.; YEH, K. T.; WANG, J. C.; KAO, M. C.; SHIH, M. C.; CHANG, J. G. Mutation analysis of the putative tumor suppression gene PTEN/MMAC1 in sporadic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.55, n.1, p.85-9, May. 1999.

CHOE, G.; HORVATH, S.; CLOUGHESY, T. F.; CROSBY, K.; SELIGSON, D.; PALOTIE, A.; INGE, L.; SMITH, B. L.; SAWYERS, C. L.; MISCHEL, P. S. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. **Cancer Res**, v.63, n.11, p.2742-6, Jun 1. 2003.

CHUNG, J. H.; GINN-PEASE, M. E.; ENG, C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. **Cancer Res**, v.65, n.10, p.4108-16, May 15. 2005.

CHUNG, M. J.; JUNG, S. H.; LEE, B. J.; KANG, M. J.; LEE, D. G. Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. **Pathol Int**, v.54, n.1, p.10-5, Jan. 2004.

COSTA, F.F. **Identificação de regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama através da técnica AP-PCR Sensível à Metilação (MSAP-PCR)**. São Paulo, 2004. 111p. Tese (Doutorado)- Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A.C. Camargo.

COHN, D. E.; BASIL, J. B.; VENEGONI, A. R.; MUTCH, D. G.; RADER, J. S.; HERZOG, T. J.; GERSELL, D. J.; GOODFELLOW, P. J. Absence of PTEN repeat tract mutation in endometrial cancers with microsatellite instability. **Gynecol Oncol**, v.79, n.1, p.101-6, Oct. 2000.

COSTELLO, J. F.; PLASS, C. Methylation matters. **J Med Genet**, v.38, n.5, p.285-303, May. 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins-Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Editora: Guanabara Koogan, 2000.

COTTRELL, S. E. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. **Clin Biochem**, v.37, n.7, p.595-604, Jul. 2004.

DAHIA, P. L.; AGUIAR, R. C.; ALBERTA, J.; KUM, J. B.; CARON, S.; SILL, H.; MARSH, D. J.; RITZ, J.; FREEDMAN, A.; STILES, C.; ENG, C. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. **Hum Mol Genet**, v.8, n.2, p.185-93, Feb. 1999.

DAHIA, P. L.; MARSH, D. J.; ZHENG, Z.; ZEDENIUS, J.; KOMMINOTH, P.; FRISK, T.; WALLIN, G.; PARSONS, R.; LONGY, M.; LARSSON, C.; ENG, C. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. **Cancer Res**, v.57, n.21, p.4710-3, Nov 1. 1997.

DAVE, B.; EASON, R. R.; TILL, S. R.; GENG, Y.; VELARDE, M. C.; BADGER, T. M.; SIMMEN, R. C. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. **Carcinogenesis**, v.26, n.10, p.1793-803, Oct. 2005.

DAVIES, M. P.; GIBBS, F. E.; HALLIWELL, N.; JOYCE, K. A.; ROEBUCK, M. M.; ROSSI, M. L.; SALISBURY, J.; SIBSON, D. R.; TACCONI, L.; WALKER, C. Mutation in the PTEN/MMAC1 gene in archival low grade and high grade gliomas. **Br J Cancer**, v.79, n.9-10, p.1542-8, Mar. 1999.

DEPOWSKI, P. L.; ROSENTHAL, S. I.; ROSS, J. S. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. **Mod Pathol**, v.14, n.7, p.672-6, Jul. 2001.

DERKS, S.; LENTJES, M. H.; HELLEBREKERS, D. M.; DE BRUINE, A. P.; HERMAN, J. G.; VAN ENGELAND, M. Methylation-specific PCR unraveled. **Cell Oncol**, v.26, n.5-6, p.291-9. 2004.

DICUONZO, G.; ANGELETTI, S.; GARCIA-FONCILLAS, J.; BRUGAROLAS, A.; OKROUZHNOV, Y.; SANTINI, D.; TONINI, G.; LORINO, G.; DE CESARIS, M.; BALDI, A. Colorectal carcinomas and PTEN/MMAC1 gene mutations. **Clin Cancer Res**, v.7, n.12, p.4049-53, Dec. 2001.

DREHER, T.; ZENTGRAF, H.; ABEL, U.; KAPPELER, A.; MICHEL, M. S.; BLEYL, U.; GROBHOLZ, R. Reduction of PTEN and p27kip1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. Analysis in radical prostatectomy specimens and needle biopsies. **Virchows Arch**, v.444, n.6, p.509-17, Jun. 2004.

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **N Engl J Med**, v.312, n.3, p.146-51, Jan 17. 1985.

DUPONT, W. D.; PARL, F. F.; HARTMANN, W. H.; BRINTON, L. A.; WINFIELD, A. C.; WORRELL, J. A.; SCHUYLER, P. A.; PLUMMER, W. D. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. **Cancer**, v.71, n.4, p.1258-65, Feb 15. 1993.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v.429, n.6990, p.457-63, May 27. 2004.

- ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer**, v.36, n.18, p.2294-300, Dec. 2000.
- ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v.21, n.35, p.5427-40, Aug 12. 2002.
- ESTELLER, M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. **Adv Exp Med Biol**, v.532, p.39-49. 2003.
- ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.45, p.629-56. 2005a.
- ESTELLER, M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. **Curr Opin Oncol**, v.17, n.1, p.55-60, Jan. 2005b.
- ESTELLER, M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. **J Pathol**, v.205, n.2, p.172-80, Jan. 2005c.
- ESTELLER, M.; CATASUS, L.; MATIAS-GUIU, X.; MUTTER, G. L.; PRAT, J.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. **Am J Pathol**, v.155, n.5, p.1767-72, Nov. 1999.
- ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol**, v.196, n.1, p.1-7, Jan. 2002.
- ESTELLER, M.; LEVINE, R.; BAYLIN, S. B.; ELLENSON, L. H.; HERMAN, J. G. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. **Oncogene**, v.17, n.18, p.2413-7, Nov 5. 1998.
- ESTELLER, M.; RISQUES, R. A.; TOYOTA, M.; CAPELLA, G.; MORENO, V.; PEINADO, M. A.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. **Cancer Res**, v.61, n.12, p.4689-92, Jun 15. 2001.
- ESTELLER, M.; TORTOLA, S.; TOYOTA, M.; CAPELLA, G.; PEINADO, M. A.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. **Cancer Res**, v.60, n.1, p.129-33, Jan 1. 2000.
- FEARON, E.R.; CHO, K.R. The molecular biology of cancer. In: Principles and practice of medical genetics. Emery, A.H.E. and Rinoio, D.L., ed. 3rd. edition. Churchill Livingstone, New York pp.405-438,1996.
- FEILOTTER, H. E.; COULON, V.; MCVEIGH, J. L.; BOAG, A. H.; DORION-BONNET, F.; DUBOUE, B.; LATHAM, W. C.; ENG, C.; MULLIGAN, L. M.; LONGY, M. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. **Br J Cancer**, v.79, n.5-6, p.718-23, Feb. 1999.

FISHEL, R.; LESCOE, M. K.; RAO, M. R.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; GARBER, J.; KANE, M.; KOLODNER, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v.77, n.1, p.167, Apr 8. 1994.

FRANCIS, A.; ENGLAND, D. W.; ROWLANDS, D. C.; WADLEY, M.; WALKER, C.; BRADLEY, S. A. The diagnosis of invasive lobular breast carcinoma. Does MRI have a role? **Breast**, v.10, n.1, p.38-40, Feb. 2001.

FREIHOF, D.; KEMPE, A.; BESTE, B.; WAPPENSCHMIDT, B.; KREYER, E.; HAYASHI, Y.; MEINDL, A.; KREBS, D.; WIESTLER, O. D.; VON DEIMLING, A.; SCHMUTZLER, R. K. Exclusion of a major role for the PTEN tumour-suppressor gene in breast carcinomas. **Br J Cancer**, v.79, n.5-6, p.754-8, Feb. 1999.

FREIRE-MAIA, N.; RIBEIRO, E. M. Dysplasias and malignancies. **Am J Med Genet**, v.113, n.4, p.390, Dec 15. 2002.

FRY, M. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? **Breast Cancer Res**, v.3, n.5, p.304-12. 2001.

GARCIA, J. M.; SILVA, J.; PENA, C.; GARCIA, V.; RODRIGUEZ, R.; CRUZ, M. A.; CANTOS, B.; PROVENCIO, M.; ESPANA, P.; BONILLA, F. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v.41, n.2, p.117-24, Oct. 2004.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, v.196, n.2, p.261-82, Jul 20. 1987.

GARINIS, G. A.; PATRINOS, G. P.; SPANAKIS, N. E.; MENOUNOS, P. G. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. **Hum Genet**, v.111, n.2, p.115-27, Aug. 2002.

GONZALEZ-ZULUETA, M.; BENDER, C. M.; YANG, A. S.; NGUYEN, T.; BEART, R. W.; VAN TORNOUT, J. M.; JONES, P. A. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Res**, v.55, n.20, p.4531-5, Oct 15. 1995.

GRADIA, S.; ACHARYA, S.; FISHEL, R. The role of mismatched nucleotides in activating the hMSH2-hMSH6 molecular switch. **J Biol Chem**, v.275, n.6, p.3922-30, Feb 11. 2000.

GREGER, V.; PASSARGE, E.; HOPPING, W.; MESSMER, E.; HORSTHEMKE, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet**, v.83, n.2, p.155-8, Sep. 1989.

GUPTA, S. K.; DOUGLAS-JONES, A. G.; FENN, N.; MORGAN, J. M.; MANSEL, R. E. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). **Cancer**, v.80, n.9, p.1740-5, Nov 1. 1997.

HALVORSEN, O. J.; HAUKAAS, S. A.; AKSLEN, L. A. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v.9, n.4, p.1474-9, Apr. 2003.

HAN, H. J.; MARUYAMA, M.; BABA, S.; PARK, J. G.; NAKAMURA, Y. Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). **Hum Mol Genet**, v.4, n.2, p.237-42, Feb. 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, Jan 7. 2000.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Appl**, v.1, n.1, p.34-8, Aug. 1991.

HAYASHI, K.; YANDELL, D. W. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum Mutat**, v.2, n.5, p.338-46. 1993.

HAYATSU, H.; WATAYA, Y.; KAZUSHIGE, K. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. **J Am Chem Soc**, v.92, n.3, p.724-6, Feb 11. 1970.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.249, p.35-54. 2000.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.18, p.9821-6, Sep 3. 1996.

HERMAN, J. G.; LATIF, F.; WENG, Y.; LERMAN, M. I.; ZBAR, B.; LIU, S.; SAMID, D.; DUAN, D. S.; GNARRA, J. R.; LINEHAN, W. M.; ET AL. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.21, p.9700-4, Oct 11. 1994.

HERMAN, J. G.; MERLO, A.; MAO, L.; LAPIDUS, R. G.; ISSA, J. P.; DAVIDSON, N. E.; SIDRANSKY, D.; BAYLIN, S. B. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. **Cancer Res**, v.55, n.20, p.4525-30, Oct 15. 1995.

HERMAN, J. G.; UMAR, A.; POLYAK, K.; GRAFF, J. R.; AHUJA, N.; ISSA, J. P.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J. K.; HAMILTON, S. R.; KINZLER, K. W.; KANE, M. F.; KOLODNER, R. D.; VOGELSTEIN, B.; KUNKEL, T. A.; BAYLIN, S. B. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.12, p.6870-5, Jun 9. 1998.

HOLLIDAY, R. DNA methylation and epigenotypes. **Biochemistry (Mosc)**, v.70, n.5, p.500-4, May. 2005.

HOLWAY, A. H.; RIEGER-CHRIST, K. M.; MINER, W. R.; CAIN, J. W.; DUGAN, J. M.; PEZZA, J. A.; SILVERMAN, M. L.; SHAPTER, A.; MCLELLAN, R.;

SUMMERHAYES, I. C. Somatic mutation of PTEN in vulvar cancer. **Clin Cancer Res**, v.6, n.8, p.3228-35, Aug. 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Os dados desta publicação também estarão disponíveis no site do INCA: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 20/11/2005.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, v.33 Suppl, p.245-54, Mar. 2003.

JENSEN, R. A.; PAGE, D. L.; DUPONT, W. D.; ROGERS, L. W. Invasive breast cancer risk in women with sclerosing adenosis. **Cancer**, v.64, n.10, p.1977-83, Nov 15. 1989.

JOHNSON-THOMPSON, M.C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, 88:1224-9, 2000.

JONES, P. A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. **Ann N Y Acad Sci**, v.983, p.213-9, Mar. 2003.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v.3, n.6, p.415-28, Jun. 2002.

KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; MCCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. **Genes Dev**, v.6, n.5, p.705-14, May. 1992.

KATO, H.; KATO, S.; KUMABE, T.; SONODA, Y.; YOSHIMOTO, T.; HAN, S. Y.; SUZUKI, T.; SHIBATA, H.; KANAMARU, R.; ISHIOKA, C. Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. **Clin Cancer Res**, v.6, n.10, p.3937-43, Oct. 2000.

KENEMANS, P.; VERSTRAETEN, R. A.; VERHEIJEN, R. H. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**, v.49, n.1, p.34-43, Sep 24. 2004.

KHAN, S.; KUMAGAI, T.; VORA, J.; BOSE, N.; SEHGAL, I.; KOEFFLER, P. H.; BOSE, S. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. **Int J Cancer**, v.112, n.3, p.407-10, Nov 10. 2004.

KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.68, n.4, p.820-3, Apr. 1971.

KNUDSON, A. G., JR. Contribution and mechanisms of genetic predisposition to cancer: hereditary cancers and anti-oncogenes. **Prog Clin Biol Res**, v.132C, p.351-60. 1983.

KNUDSON, A. G., JR. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res**, v.45, n.4, p.1437-43, Apr. 1985.

KNUDSON, A. G., JR. Prince Takamatsu memorial lecture. Rare cancers: clues to genetic mechanisms. **Princess Takamatsu Symp**, v.18, p.221-31. 1987.

KNUDSON, A. G., JR. Overview: genes that predispose to cancer. **Mutat Res**, v.247, n.2, p.185-90, Apr. 1991.

KOBAYASHI, H.; HOSODA, F.; MASEKI, N.; SAKURAI, M.; IMASHUKU, S.; OHKI, M.; KANEKO, Y. Hematologic malignancies with the t(10;11) (p13;q21) have the same molecular event and a variety of morphologic or immunologic phenotypes. **Genes Chromosomes Cancer**, v.20, n.3, p.253-9, Nov. 1997.

KUNKEL, T. A.; ERIE, D. A. DNA mismatch repair. **Annu Rev Biochem**, v.74, p.681-710. 2005.

KUROSE, K.; GILLEY, K.; MATSUMOTO, S.; WATSON, P. H.; ZHOU, X. P.; ENG, C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. **Nat Genet**, v.32, n.3, p.355-7, Nov. 2002.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.4, p.253-66, Apr. 2003.

LAIRD, P. W. Cancer epigenetics. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, p.R65-76, Apr 15. 2005.

LAKHANI, S. R.; VAN DE VIJVER, M. J.; JACQUEMIER, J.; ANDERSON, T. J.; OSIN, P. P.; MCGUFFOG, L.; EASTON, D. F. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. **J Clin Oncol**, v.20, n.9, p.2310-8, May 1. 2002.

LEE, J. O.; YANG, H.; GEORGESCU, M. M.; DI CRISTOFANO, A.; MAEHAMA, T.; SHI, Y.; DIXON, J. E.; PANDOLFI, P.; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell**, v.99, n.3, p.323-34, Oct 29. 1999.

LESLIE, N. R.; DOWNES, C. P. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. **Biochem J**, v.382, n.Pt 1, p.1-11, Aug 15. 2004.

LEWIN, B.; FERREIRA, H.; PASQUALI, G.; PASSAGLIA, L.M.P.; TEIXEIRA, M.C.C.; MILACH, S.C.K.; BOGO, M.R. *Genes VII*, Artmed Editora, Porto Alegre, (2001) 28:837-875.

LI, D. M.; SUN, H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. **Cancer Res**, v.57, n.11, p.2124-9, Jun 1. 1997.

LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSYPANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S. I.; PUC, J.; MILIAREISIS, C.; RODGERS, L.; MCCOMBIE, R.; BIGNER, S. H.; GIOVANELLA, B. C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M. H.; PARSONS, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v.275, n.5308, p.1943-7, Mar 28. 1997.

- LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v.18, n.11, p.1427-31, Nov. 2002.
- LINDAHL, T.; WOOD, R. D. Quality control by DNA repair. **Science**, v.286, n.5446, p.1897-905, Dec 3. 1999.
- LINDBLOM, A.; TANNERGARD, P.; WERELIUS, B.; NORDENSKJOLD, M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. **Nat Genet**, v.5, n.3, p.279-82, Nov. 1993.
- LIU, J.; BABAIAN, D. C.; LIEBERT, M.; STECK, P. A.; KAGAN, J. Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens. **Mol Carcinog**, v.29, n.3, p.143-50, Nov. 2000.
- LOURO, I. D.; LLERENA JR.; JUAN C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON PROLLA, P.; CONFORTI-FRÓES, N. **Genética Molecular do Câncer**. 2.ed. São Paulo MSG Produção Editorial, 2002.
- LYKO, F.; BROWN, R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. **J Natl Cancer Inst**, v.97, n.20, p.1498-506, Oct 19. 2005.
- LYNCH, E. D.; OSTERMEYER, E. A.; LEE, M. K.; ARENA, J. F.; JI, H.; DANN, J.; SWISSHELM, K.; SUCHARD, D.; MACLEOD, P. M.; KVINNSLAND, S.; GJERTSEN, B. T.; HEIMDAL, K.; LUBS, H.; MOLLER, P.; KING, M. C. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. **Am J Hum Genet**, v.61, n.6, p.1254-60, Dec. 1997.
- MACALUSO, M.; PAGGI, M. G.; GIORDANO, A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6472-8, Sep 29. 2003.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem**, v.273, n.22, p.13375-8, May 29. 1998.
- MANSOUR, E. G.; RAVDIN, P. M.; DRESSLER, L. Prognostic factors in early breast carcinoma. **Cancer**, v.74, n.1 Suppl, p.381-400, Jul 1. 1994.
- MARSH, D. J.; DAHIA, P. L.; COULON, V.; ZHENG, Z.; DORION-BONNET, F.; CALL, K. M.; LITTLE, R.; LIN, A. Y.; EELES, R. A.; GOLDSTEIN, A. M.; HODGSON, S. V.; RICHARDSON, A. L.; ROBINSON, B. G.; WEBER, H. C.; LONGY, M.; ENG, C. Allelic imbalance, including deletion of PTEN/MMAC1, at the Cowden disease locus on 10q22-23, in hamartomas from patients with Cowden syndrome and germline PTEN mutation. **Genes Chromosomes Cancer**, v.21, n.1, p.61-9, Jan. 1998.
- MCGREGOR, W. G. DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v.4, n.1, p.1-5, Sep. 1999.

MCGUIRE, W. L.; TANDON, A. K.; ALLRED, D. C.; CHAMNESS, G. C.; RAVDIN, P. M.; CLARK, G. M. Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. **Cancer**, v.70, n.6 Suppl, p.1775-81, Sep 15. 1992.

MERLO, A.; HERMAN, J. G.; MAO, L.; LEE, D. J.; GABRIELSON, E.; BURGER, P. C.; BAYLIN, S. B.; SIDRANSKY, D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat Med**, v.1, n.7, p.686-92, Jul. 1995.

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6479-83, Sep 29. 2003.

MOMPARLER, R. L.; AYOUB, J. Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.34 Suppl 4, p.S111-5, Dec. 2001.

MOMPARLER, R. L.; BOVENZI, V. DNA methylation and cancer. **J Cell Physiol**, v.183, n.2, p.145-54, May. 2000.

MORIYA, T.; SILVERBERG, S. G. Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ) of the breast. A comparison of pure noninvasive tumors with those including different proportions of infiltrating carcinoma. **Cancer**, v.74, n.11, p.2972-8, Dec 1. 1994.

MURATA, H.; KHATTAR, N. H.; GU, L.; LI, G. M. Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. **Cancer Lett**, v.223, n.1, p.143-50, Jun 1. 2005.

MURATA, H.; KHATTAR, N. H.; KANG, Y.; GU, L.; LI, G. M. Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. **Oncogene**, v.21, n.37, p.5696-703, Aug 22. 2002.

MURGO, A. J. Innovative approaches to the clinical development of DNA methylation inhibitors as epigenetic remodeling drugs. **Semin Oncol**, v.32, n.5, p.458-64, Oct. 2005.

MUTTER, G. L.; LIN, M. C.; FITZGERALD, J. T.; KUM, J. B.; BAAK, J. P.; LEES, J. A.; WENG, L. P.; ENG, C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.11, p.924-30, Jun 7. 2000.

NASSIF, N. T.; LOBO, G. P.; WU, X.; HENDERSON, C. J.; MORRISON, C. D.; ENG, C.; JALALUDIN, B.; SEGELOV, E. PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. **Oncogene**, v.23, n.2, p.617-28, Jan 15. 2004.

NEPHEW, K. P.; HUANG, T. H. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer Lett**, v.190, n.2, p.125-33, Feb 20. 2003.

NEWELL-PRICE, J.; KING, P.; CLARK, A. J. The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. **Mol Endocrinol**, v.15, n.2, p.338-48, Feb. 2001.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v.194, n.4260, p.23-8, Oct 1. 1976.

OKAHARA, F.; IKAWA, H.; KANAHO, Y.; MAEHAMA, T. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. **J Biol Chem**, v.279, n.44, p.45300-3, Oct 29. 2004.

OLAUSSEN, K. A.; SORIA, J. C.; MORAT, L.; MARTIN, A.; SABATIER, L.; MORERE, J. F.; KHAYAT, D.; SPANO, J. P. Loss of PTEN expression is not uncommon, but lacks prognostic value in stage I NSCLC. **Anticancer Res**, v.23, n.6C, p.4885-90, Nov-Dec. 2003.

PANIGRAHI, A. R.; PINDER, S. E.; CHAN, S. Y.; PAISH, E. C.; ROBERTSON, J. F.; ELLIS, I. O. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. **J Pathol**, v.204, n.1, p.93-100, Sep. 2004.

PAPADOPOULOS, N.; NICOLAIDES, N. C.; WEI, Y. F.; RUBEN, S. M.; CARTER, K. C.; ROSEN, C. A.; HASELTINE, W. A.; FLEISCHMANN, R. D.; FRASER, C. M.; ADAMS, M. D.; ET AL. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v.263, n.5153, p.1625-9, Mar 18. 1994.

PERREN, A.; KOMMINOTH, P.; SAREMASLANI, P.; MATTER, C.; FEURER, S.; LEES, J. A.; HEITZ, P. U.; ENG, C. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. **Am J Pathol**, v.157, n.4, p.1097-103, Oct. 2000.

PERREN, A.; WENG, L. P.; BOAG, A. H.; ZIEBOLD, U.; THAKORE, K.; DAHIA, P. L.; KOMMINOTH, P.; LEES, J. A.; MULLIGAN, L. M.; MUTTER, G. L.; ENG, C. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. **Am J Pathol**, v.155, n.4, p.1253-60, Oct. 1999.

PETROCELLI, T.; SLINGERLAND, J. M. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis. **Breast Cancer Res**, v.3, n.6, p.356-60. 2001.

PONDER, B. A. Cancer genetics. **Nature**, v.411, n.6835, p.336-41, May 17. 2001.

RASHEED, B. K.; MCLENDON, R. E.; FRIEDMAN, H. S.; FRIEDMAN, A. H.; FUCHS, H. E.; BIGNER, D. D.; BIGNER, S. H. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. **Oncogene**, v.10, n.11, p.2243-6, Jun 1. 1995.

RASHEED, B. K.; STENZEL, T. T.; MCLENDON, R. E.; PARSONS, R.; FRIEDMAN, A. H.; FRIEDMAN, H. S.; BIGNER, D. D.; BIGNER, S. H. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. **Cancer Res**, v.57, n.19, p.4187-90, Oct 1. 1997.

RAVEL, R. M.D. Laboratório Clínico.6.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan,1997.

REENAN, R. A.; KOLODNER, R. D. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. **Genetics**, v.132, n.4, p.975-85, Dec. 1992.

RHEI, E.; KANG, L.; BOGOMOLNIY, F.; FEDERICI, M. G.; BORGEM, P. I.; BOYD, J. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. **Cancer Res**, v.57, n.17, p.3657-9, Sep 1. 1997.

RIZO, J.; SUDHOF, T. C. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. **J Biol Chem**, v.273, n.26, p.15879-82, Jun 26. 1998.

ROA, J. C.; ANABALON, L.; TAPIA, O.; MARTINEZ, J.; ARAYA, J. C.; VILLASECA, M.; GUZMAN, P.; ROA, I. [Promoter methylation profile in breast cancer]. **Rev Med Chil**, v.132, n.9, p.1069-77, Sep. 2004.

ROBERTI, A.; SALA, D. L.; CINTI, C. Multiple genetic and epigenetic interacting mechanisms contribute to clonally selection of drug-resistant tumors: Current views and new therapeutic prospective. **J Cell Physiol**, Oct 25. 2005.

ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.461-7, Mar. 2000.

ROCKWELL, S.; YUAN, J.; PERETZ, S.; GLAZER, P. M. Genomic instability in cancer. **Novartis Found Symp**, v.240, p.133-42; discussion 142-51. 2001.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Development of the human breast. **Maturitas**, v.49, n.1, p.2-15, Sep 24. 2004.

SANO, T.; LIN, H.; CHEN, X.; LANGFORD, L. A.; KOUL, D.; BONDY, M. L.; HESS, K. R.; MYERS, J. N.; HONG, Y. K.; YUNG, W. K.; STECK, P. A. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Res**, v.59, n.8, p.1820-4, Apr 15. 1999.

SANSAL, I.; SELLERS, W. R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. **J Clin Oncol**, v.22, n.14, p.2954-63, Jul 15. 2004.

SASAKI, S.; HORII, A.; SHIMADA, M.; HAN, H. J.; YANAGISAWA, A.; MUTO, T.; NAKAMURA, Y. Somatic mutations of a human mismatch repair gene, hMLH1, in tumors from patients with multiple primary cancers. **Hum Mutat**, v.7, n.3, p.275-8. 1996.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annu Rev Microbiol**, v.57, p.579-608. 2003.

SELMANE, T.; SCHOFIELD, M. J.; NAYAK, S.; DU, C.; HSIEH, P. Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. **J Mol Biol**, v.334, n.5, p.949-65, Dec 12. 2003.

SHAPIRO, R.; COHEN, B. I.; SERVIS, R. E. Specific deamination of RNA by sodium bisulphite. **Nature**, v.227, n.5262, p.1047-8, Sep 5. 1970.

- SIMPSON, L.; PARSONS, R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res**, v.264, n.1, p.29-41, Mar 10. 2001.
- SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. **Blood**, v.93, n.12, p.4059-70, Jun 15. 1999.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J. **Principles of genetics**, 2<sup>nd</sup> ed, Jonh Wiley & Sons Inc (2000) 28:750-771.
- SON, B. H.; AHN, S. H.; KO, C. D.; KA, I. W.; GONG, G. Y.; KIM, J. C. Significance of mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast. **Breast J**, v.10, n.1, p.20-6, Jan-Feb. 2004.
- SORIA, J. C.; LEE, H. Y.; LEE, J. I.; WANG, L.; ISSA, J. P.; KEMP, B. L.; LIU, D. D.; KURIE, J. M.; MAO, L.; KHURI, F. R. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. **Clin Cancer Res**, v.8, n.5, p.1178-84, May. 2002.
- SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HATIE, T.; EINSEN, M.E.; RIJN, MV.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, PE.; BORRENSEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with cinical implications. **Medical Sciences.**, v. 98, n.19,p.10869-10874, 2001.
- STECK, P. A.; PERSHOUSE, M. A.; JASSER, S. A.; YUNG, W. K.; LIN, H.; LIGON, A. H.; LANGFORD, L. A.; BAUMGARD, M. L.; HATTIER, T.; DAVIS, T.; FRYE, C.; HU, R.; SWEDLUND, B.; TENG, D. H.; TAVTIGIAN, S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet**, v.15, n.4, p.356-62, Apr. 1997.
- STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Rev Mol Med**, v.2002, p.1-17, Mar 4. 2002.
- SUBRAMANIAN, B.; AXELROD, D. E. Progression of heterogeneous breast tumors. **J Theor Biol**, v.210, n.1, p.107-19, May 7. 2001.
- TANIYAMA, K.; GOODISON, S.; ITO, R.; BOOKSTEIN, R.; MIYOSHI, N.; TAHARA, E.; TARIN, D.; URQUIDI, V. PTEN expression is maintained in sporadic colorectal tumours. **J Pathol**, v.194, n.3, p.341-8, Jul. 2001.
- TASHIRO, H.; BLAZES, M. S.; WU, R.; CHO, K. R.; BOSE, S.; WANG, S. I.; LI, J.; PARSONS, R.; ELLENSON, L. H. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. **Cancer Res**, v.57, n.18, p.3935-40, Sep 15. 1997.

TENG, D. H.; HU, R.; LIN, H.; DAVIS, T.; ILIEV, D.; FRYE, C.; SWEDLUND, B.; HANSEN, K. L.; VINSON, V. L.; GUMPPER, K. L.; ELLIS, L.; EL-NAGGAR, A.; FRAZIER, M.; JASSER, S.; LANGFORD, L. A.; LEE, J.; MILLS, G. B.; PERSHOUSE, M. A.; POLLACK, R. E.; TORNOS, C.; TRONCOSO, P.; YUNG, W. K.; FUJII, G.; BERSON, A.; STECK, P. A.; ET AL. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. **Cancer Res**, v.57, n.23, p.5221-5, Dec 1. 1997.

THE CANCER COUNCIL VICTORIA. Breast health. Disponível em: <<http://www.cancervic.org.au/cancer1/prevent/breasthealth.htm>>. Acesso em: 24/01/2006.

TLSTY, T. D.; CRAWFORD, Y. G.; HOLST, C. R.; FORDYCE, C. A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M. L. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.9, n.3, p.263-74, Jul. 2004.

TOYOTA, M.; ISSA, J. P. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. **Semin Cancer Biol**, v.9, n.5, p.349-57, Oct. 1999.

TRYBUS, T. M.; BURGESS, A. C.; WOJNO, K. J.; GLOVER, T. W.; MACOSKA, J. A. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. **Cancer Res**, v.56, n.10, p.2263-7, May 15. 1996.

TSOU, H. C.; TENG, D. H.; PING, X. L.; BRANCOLINI, V.; DAVIS, T.; HU, R.; XIE, X. X.; GRUENER, A. C.; SCHRAGER, C. A.; CHRISTIANO, A. M.; ENG, C.; STECK, P.; OTT, J.; TAVTIGIAN, S. V.; PEACOCKE, M. The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. **Am J Hum Genet**, v.61, n.5, p.1036-43, Nov. 1997.

TSUDA, H.; HIROHASHI, S. Multiple developmental pathways of highly aggressive breast cancers disclosed by comparison of histological grades and c-erbB-2 expression patterns in both the non-invasive and invasive portions. **Pathol Int**, v.48, n.7, p.518-25, Jul. 1998.

VAZQUEZ, F.; RAMASWAMY, S.; NAKAMURA, N.; SELLERS, W. R. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. **Mol Cell Biol**, v.20, n.14, p.5010-8, Jul. 2000.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol**, v.3, n.12, p.755-63, Dec. 2002.

VOGEL, V. G. Atypia in the assessment of breast cancer risk: implications for management. **Diagn Cytopathol**, v.30, n.3, p.151-7, Mar. 2004.

WAITE, K. A.; ENG, C. Protean PTEN: form and function. **Am J Hum Genet**, v.70, n.4, p.829-44, Apr. 2002.

WAJED, S. A.; LAIRD, P. W.; DEMEESTER, T. R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. **Ann Surg**, v.234, n.1, p.10-20, Jul. 2001.

WANG, S. I.; PUC, J.; LI, J.; BRUCE, J. N.; CAIRNS, P.; SIDRANSKY, D.; PARSONS, R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. **Cancer Res**, v.57, n.19, p.4183-6, Oct 1. 1997.

WU, Y.; DOWBENKO, D.; SPENCER, S.; LAURA, R.; LEE, J.; GU, Q.; LASKY, L. A. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. **J Biol Chem**, v.275, n.28, p.21477-85, Jul 14. 2000.

YUAN, Z. Q.; GOTTLIEB, B.; BEITEL, L. K.; WONG, N.; GORDON, P. H.; WANG, Q.; PUISIEUX, A.; FOULKES, W. D.; TRIFIRO, M. Polymorphisms and HNPCC: PMS2-MLH1 protein interactions diminished by single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat**, v.19, n.2, p.108-13, Feb. 2002.

ZHOU, X. P.; LI, Y. J.; HOANG-XUAN, K.; LAURENT-PUIG, P.; MOKHTARI, K.; LONGY, M.; SANSON, M.; DELATTRE, J. Y.; THOMAS, G.; HAMELIN, R. Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. **Int J Cancer**, v.84, n.2, p.150-4, Apr 20. 1999.

ZHOU, X. P.; LOUKOLA, A.; SALOVAARA, R.; NYSTROM-LAHTI, M.; PELTOMAKI, P.; DE LA CHAPELLE, A.; AALTONEN, L. A.; ENG, C. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. **Am J Pathol**, v.161, n.2, p.439-47, Aug. 2002.

ZHU, W. G.; OTTERSON, G. A. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. **Curr Med Chem Anti-Canc Agents**, v.3, n.3, p.187-99, May. 2003.