

BC/29214
IB/81008

DETECÇÃO DE INSTABILIDADE DE MICROSATÉLITES EM CÂNCER DE MAMA

LEE WEN HWA

Orientação: Profa. Dra. Solange Bento Farah

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração Genética Humana.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de Mestrado (a) candidato (a)
Lee Wen Hwa

e aprovada pela Comissão Julgadora.

22/10/96 Mariana Blandi de Aguiar

CAMPINAS
1996

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA	I/UNICAMP
	L516d
V. E.	
TCMBO BC	29214
PROC.	667/96
C	☐ 0 ☒ 1
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/11/96
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00095024-4

L516d

Lee, Wen Hwa

Detecção de instabilidade de microsátélites em
cancer de mama / Lee Wen Hwa. - Campinas, SP :
[s.n.], 1996.

Orientador: Solange Bento Farah.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

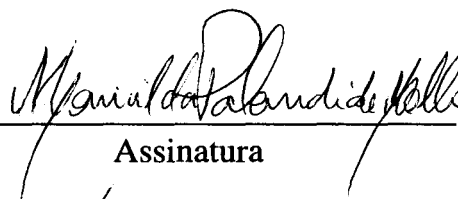
1. Genética molecular. 2. Mamas - Cancer.
I. Farah, Solange Bento. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III Título.

Local e Data: Campinas, 22 de outubro de 1996

Banca Examinadora:

Titulares:

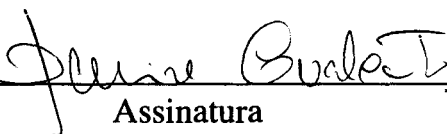
Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello
(Presidente de Banca)


Assinatura

Profa. Dra. Christine Hackel


Assinatura

Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti


Assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Janete Maria Cerutti


Assinatura

APROVADO

Aos meus pais, que *sempre* lutaram
para que nada me faltasse, mesmo
em terra estranha, língua estranha e
cultura estranha...

Agradecimentos

À Solange, que me recebeu há uns bons anos atrás (como um irrequieto ←(chequei no Aurélião) estagiário) e me deu a chance de conhecer o fascinante mundo da Genética - obrigado Chefa!

À Profa. Dra. Christine Hackel, por aceitar ser banca e pré-banca desta tese e por suas preciosas sugestões (além do mais, acho que sei quem foi a relatora da minha tese! ☺).

À caríssima Jane (ou Dra. Janete !) pela amizade no convívio, o cuidado e a atenção com que fez a minha pré-banca (lógico - ela é assim com tudo!) - grazie!!

À Denise Pontes Cavalcanti, por sempre ter topado participar de todas as bancas examinadoras da minha tese - qualificação, pré-banca e banca! - e sempre ajudando com ótimos conselhos. Haja fôlego!! Obrigadão Denise!

E por falar em bancas, meus sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Laura Ottoboni e ao Prof. Dr. Adilson Leite pelas preciosas (e sinceras também) críticas e sugestões que me foram dados durante o exame de qualificação.

À Cilda, mais conhecida como Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, pelo inestimável e completo apoio que recebi (durante as inevitáveis viagens da Solange), inclusive representando a chefe na presidência da minha banca! Muito obrigado!!

À Márcia Chia Miao Mah, que apesar do pouco tempo com a gente, foi quem ajudou a iniciar este projeto.

À Roberta do Amaral Andrade Uchôa e ao Arnaldo Medeiros, do Instituto Ludwig, por estarem sempre dispostos a nos ajudar nos quesitos *primer* e discussões técnicas.

À Luciana Amaral Haddad, ao Alberto Fujiwara e ao Dr. Sérgio Danilo Pena, pelos *primers* do EST 493, gentilmente cedidos.

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pela inestimável ajuda quando precisei me arriscar no nebuloso campo da estatística.

Aos docentes e residentes da divisão de Oncologia do CAISM e a todos do Centro Cirúrgico (CAISM) pela inestimável ajuda durante a (ádua) fase de coleta de material dos pacientes deste estudo.

À Teresa (que fica naquela salinha da genética) e a todas da secretaria (Claudinha, Fabiana, Tânia e Sandra), obrigadão pelos galhos burocráticos que vocês já me quebraram!

A todos os amigos deste CBMEG, que sempre me ajudaram quando foi necessário. A todo o pessoal de plantas (Dante, Andrés, André, Edson, Germano, Felipe, Rachel *et al.*), ao povo do RFLP (Sibão, Lu Barbie), às Animalescas (Sílvia, Ju, Ana e co.) e aos Bacterianos.

À Berê, que faz os melhores géis de poliacrilamida que já experimentei!

A Edi e a Isa, pela inestimável ajuda que as duas me deram neste tempo todo (e que me conheceram quando tinha espinhas na testa!)

À Juli, minha primeira-sombra nos tempos áureos de aperfeiçoamento, pelo seu bom humor e disposição, pela sua grande ajuda neste projeto e, como poderia me esquecer: Madázinha!! Que faz os melhores tampões e soluções do mundo e que é a dona do melhor humor do CBMEG inteiro! Obrigadíssimo a vocês duas!!

À Ivy (e o seu respectivo Zé-Henrique), pela agradabilíssima companhia que ambos são, à Luzinha, que sempre contribuiu com o seu bom senso e discutiu comigo, e ao Carlos por ter me emprestado esta maravilha tecnológica para terminar de escrever a tese!

Ao EDs (como diria o nosso porteiro) - 'a praga que dizimou o Egito' (Araújo *et al.*, 1996) por todo apoio e amizade que me deu durante o andamento desta tese e também pela agradável convivência, sem a qual não teria sossego para realizar este estudo! Valeu, hein, ED!

À meia-irmã em Campinas, MáMá, também pela inestimável amizade e solicitude com que sempre me ofereceu ajuda. Sem contar as inúmeras baboseiras que a gente fala quando todos se encontram! (Pink Fróide e H.Estér!)

À San-San (Alô? Kátia? Carla?), a única detentora da San-consciência (desculpem o trocadilho, não resisti!) dentre o pessoal que conheço, obrigação pela amizade (ô cara☛*☛☛... preciso comprar um dicionário de sinônimos) sincera.

À minha querida, amada e homóloga (lembra-se dos abraços na rua?! parecia crossing-over!!) Nela, que chegou em um momento muito importante da minha vida, e que me deu a maior força (literalmente a maior de todas) para continuar firme na tese e terminá-la - o seu carinho e o seu amor! Obrigado Nelinda, de coração!♥♥♥

Aos meus irmãos: Kang, Jeanny e William, que apesar de tudo, fazem a razão principal da minha luta (afinal a minha mãe sempre disse que EU é quem tinha de dar o exemplo...☺).

Aos meus pais, que apesar das terríveis dificuldades pelas quais passaram nesta cultura totalmente diferente, fizeram de tudo por mim e meus irmãos. São reais exemplos de coragem e força que quero tornar públicos, pois são as pessoas que realmente merecem o título que vou carregar!

E finalmente, a *Deus* (no sentido mais amplo da palavra - afinal Deus não precisa de nomes...nós é que necessitamos nomeá-lo) - pois 'o Senhor é o meu Pastor e nada me faltará'.

Bibliografia

Araújo, M. & Mello, M.P. Estudo da Organização Molecular do 'cluster' Gênico CYP21 e C4 em Famílias com a Forma Clássica de Deficiência da 21-Hidroxilase no Brasil. *Tese de Dissertação* - Biblioteca do IB - UNICAMP, 1996.

PS.: Devo ser o primeiro do Mundo a ter um 'Agradecimentos' com Bibliografia !!☺☺☺

INTRODUÇÃO	1
O CÂNCER	1
O CÂNCER DE MAMA	5
1. INCIDÊNCIA	5
2. ETIOLOGIA E FATORES DE RISCO	6
3. TIPOS HISTOLÓGICOS	11
4. ESTADIAMENTO	13
T - TUMOR PRIMÁRIO	14
N - LINFONODOS REGIONAIS	16
M - METÁSTASES A DISTÂNCIA	16
BASES GENÉTICAS DO CÂNCER DE MAMA	17
BRCA1 E BRCA2	17
MICROSATÉLITES	19
PRIMEIRAS APLICAÇÕES	22
INSTABILIDADE DE MICROSATÉLITES	23
DOENÇAS CORRELACIONADAS	30
INSTABILIDADE EM CÂNCER	33
INSTABILIDADE EM CÂNCER DE MAMA	36
SISTEMAS DE REPARO	37
PERDA DE HETEROZIGOSIDADE	40
OBJETIVOS	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
CASUÍSTICA	43
DADOS ANAMNÉSICOS	43
COLETA DE MATERIAL	43
A. SANGUE	44
B. TUMOR	44
EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	45
A. SANGUE	45
B. TUMOR	45
PARTE 1: PROCESSAMENTO PRÉ-EXTRAÇÃO - FRAGMENTAÇÃO COM BISTURI	45
PARTE 2: EXTRAÇÃO PROPRIAMENTE DITA	46
MARCAÇÃO RADIOATIVA DOS PRIMERS	46
PCR COM PRIMERS LOCUS-ESPECÍFICO	46
MICROSATÉLITE D17S807 (YEE ET AL, 1994)	47
MICROSATÉLITE AR XQ11-12 (YEE ET AL., 1994)	47
MICROSATÉLITE D10S89 (WEBER & MAY, 1989)	48
MICROSATÉLITE EST493 (HADDAD ET AL., COMUNICAÇÃO PESSOAL)	48
ANÁLISE DAS AMOSTRAS	48
AUTORRADIOGRAFIAS	49
MÉTODOS ESTATÍSTICOS	49

<i>RESULTADOS</i>	<i>51</i>
<i>LOCUS AR</i>	<i>54</i>
<i>LOCUS D17S807</i>	<i>56</i>
<i>LOCUS D10S89</i>	<i>56</i>
<i>LOCUS EST 493</i>	<i>57</i>
<i>DISCUSSÃO</i>	<i>59</i>
<i>MICROSATÉLITE D17S807</i>	<i>59</i>
<i>MICROSATÉLITE AR</i>	<i>62</i>
<i>MICROSATÉLITE D10S89</i>	<i>64</i>
<i>MICROSATÉLITE EST 493</i>	<i>65</i>
<i>A INSTABILIDADE EM CÂNCER DE MAMA</i>	<i>67</i>
<i>ANÁLISE COMPARATIVA COM OUTROS TIPOS TUMORAIS</i>	<i>71</i>
<i>CORRELAÇÕES CLÍNICAS</i>	<i>72</i>
<i>INSTABILIDADE GERMINATIVA E INSTABILIDADE SOMÁTICA</i>	<i>74</i>
<i>PERDA DE HETEROZIGOSIDADE</i>	<i>75</i>
<i>CONSIDERAÇÕES GERAIS</i>	<i>75</i>
<i>RESUMO</i>	<i>78</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>79</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>80</i>

INTRODUÇÃO

O Câncer

O câncer é conhecido desde o tempo em que as sociedades humanas aprenderam a registrar as suas atividades. Era bem conhecido pelos antigos egípcios e as civilizações subsequentes. Entretanto, a maioria dos cânceres se desenvolve tardiamente na vida de um ser e, até que a expectativa de vida começasse a aumentar na metade do século XIX, o número de pessoas sobrevivendo até a "idade do câncer" era relativamente baixo. Agora que grande parte dos problemas comuns da infância e as doenças infecciosas foram sanados, a proporção de pessoas mais velhas sob risco aumentou de forma dramática. Aliado a este fato, os diagnósticos atuais estão cada vez mais precisos e sensíveis. Assim doenças que antes não eram caracterizadas como câncer, hoje já o são, aumentando a quantidade de registros de ocorrência desta doença. Embora as doenças cardíacas e vasculares ainda representem a maior causa de morte entre as pessoas idosas, o câncer é um problema importante. Pelo menos uma em cada cinco pessoas desenvolverá alguma forma de câncer e por essa razão é muito importante que se possa controlá-lo ou, ainda melhor, preveni-lo. Devido à sua natureza, o câncer não afeta apenas o homem e os mamíferos superiores, podendo atingir praticamente todos os organismos multicelulares, vegetais ou animais. Uma vez que provoca alterações no crescimento e desenvolvimento celulares, a compreensão dos processos que levam à doença contribuirá para o conhecimento dos mecanismos vitais básicos.

A princípio o câncer é uma desordem celular e é difícil definir uma célula tumoral em termos absolutos, porém os tumores são normalmente reconhecidos pelo fato de que as suas células apresentam crescimento anormal. Assim, uma definição razoável é a de que a célula tumoral difere da normal por não mais responder aos mecanismos de controle de crescimento normais. Uma vez que há muitos fatores envolvidos neste processo, a célula alterada poderá continuar respondendo a alguns deles, mas não a outros. Tal hipótese é reforçada pelo fato de algumas células tumorais cessarem o seu crescimento, especialmente após a transformação, sugerindo diferentes mecanismos envolvidos. Assim, no presente momento, qualquer definição deve ser considerada como "operacional" (Franks, 1991).

A carcinogênese, ou seja, o processo pelo qual uma célula normal se desenvolve até uma tumoral, é constituída por múltiplas etapas e dependente de

três itens que regem todas as etapas da carcinogênese: os agentes iniciadores, os promotores e os inibidores de crescimento.

Os agentes iniciadores são fatores que propiciam a ocorrência de alterações nos mecanismos normais de controle de crescimento celular, principalmente em relação ao DNA. Assim uma célula iniciada é potencialmente tumoral. Potencialmente, pois as células iniciadas permanecem latentes até que sobre elas atuem os agentes promotores. Muitas destas células transformadas nunca crescerão ou o farão muito lentamente. Os agentes promotores, que não são carcinogênicos em si, induzirão então a divisão celular num tecido iniciado. Muitos agentes são indutores de divisão celular, mas somente os promotores provocarão desenvolvimento tumoral, de forma que, embora o crescimento celular seja necessário para o desenvolvimento do tumor, outros fatores deverão também estar envolvidos. É possível que os agentes promotores interfiram no processo de diferenciação, que normalmente ocorre quando as células passam da população de células em divisão para células funcionantes e que normalmente não mais se dividem. Embora estes estímulos promotores de crescimento estejam agindo nas células, eles ainda são sensíveis aos fatores normais de inibição de crescimento no corpo, de modo que o resultado final depende do balanço entre os fatores normais e a extensão das mudanças ocorridas nas células diferenciadas. Isto explica porque tumores pré-neoplásicos ou mesmo, aparentemente, totalmente transformados podem ser encontrados, mas não parecem estar crescendo e, algumas vezes, até mesmo regredem (Franks, 1991).

Com o avanço da biologia molecular e celular, pudemos observar dois novos e importantes componentes etiológicos deste tipo de doença: os oncogenes e as alterações cromossômicas associadas.

O termo oncogene foi criado para designar um gene capaz de causar câncer. Naturalmente é um termo muito genérico pois o câncer como um todo não se restringiria à ação de um único gene (existem sistemas poligênicos além de outras variantes celulares e ambientais envolvidos para, conjuntamente, causar um câncer), apesar dele ser um iniciador em potencial. Tais genes foram inicialmente encontrados em vírus e notou-se uma grande relação destes genes com a ocorrência de câncer em vários casos, induzindo a ocorrência de tumores em curtos período de latência. O interessante nestes casos é a alteração do genoma selvagem do vírus para uma outra sequência contendo inserções de novas informações. Outro fato é que mesmo o vírus sem alterações na sua sequência pode causar câncer. Tal mecanismo se baseia na transfecção sítio-específica de provírus em certos locais (lembrando muito os transposons), tais

como regiões codificadoras ou promotores de algum gene importante para o controle celular, anulando a sua função.

Até agora determinou-se duas classes principais de genes de acordo com o seu mecanismo de ação, os quais, quando afetados por mutações podem participar do processo da tumorigênese: os proto-oncogenes (Bishop, 1987) e os genes supressores de tumor (Klein, 1987; Friend *et al.*, 1988; Sager, 1989).

Os proto-oncogenes são os genes celulares homólogos aos oncogenes presentes nos vírus. Assim, temos presente nas células tais genes que normalmente estão envolvidos no controle do crescimento e diferenciação celular. Porém, quando afetados por certas mutações, esses genes passam a produzir em demasia tais fatores levando as células a crescerem de maneira descontrolada ou até mesmo a não mais reconhecerem sinais de inibição deste crescimento.

Já os genes supressores agem inibindo a transformação de células normais. A presença de apenas um alelo é suficiente para a inibição de tumorigênese. Assim, para que um câncer se desenvolva resultante de mutações nestes genes é necessário que ambos alelos sejam desativados. Por essa razão esses genes também são chamados de oncogenes recessivos. Desta maneira é possível entender porque as perdas alélicas verificada em vários cânceres (em comparações de tecidos normais/pré-tumores com tecidos tumorais) ocorrem.

Muitos tumores tem aberrações estruturais e/ou numéricas em seus cromossomos, algumas das quais consistentemente associadas a tipos específicos de tumores. De uma maneira geral podemos definir três tipos principais de alterações, relacionadas às características celulares próprias, embora não se saiba ao certo a razão desta associação. Assim temos rearranjos, constituídos por translocações e inversões, as deleções e mutações pontuais e as amplificações.(Franks, 1991).

Um exemplo claro de como as alterações cromossômicas podem agir na tumorigênese se encontra nas translocações associadas à geração de linfomas de Burkitt. Neste caso o proto-oncogene *c-myc* é justaposto aos genes de imunoglobulina. Com isso, o *c-myc* acabou entrando nos limites de ação do *enhancer*, e assim resultam numa transcrição aumentada do proto-oncogene, causando o câncer.

Existe ainda mais um componente importante nas pesquisas atuais: a predisposição herdada ao câncer. Desde o início foi observado uma tendência, em algumas famílias, de recorrência de um mesmo tipo de câncer em diferentes membros da genealogia. Com a constatação de que a origem principal dos problemas é em relação aos genes, esforços foram dobrados no sentido de

entender o comportamento dos mecanismos que propiciam câncer às gerações subsequentes. No presente momento ainda não se determinou com exatidão toda a dinâmica deste fenômeno, porém já se conseguiu classificar em alguns grupos os diversos tipos de predisposição.

Podemos classificar, então, as predisposições herdadas ao câncer em quatro grandes grupos: cânceres síndrômicos herdados, cânceres familiares, predisposições herdadas sem agrupamento familiar evidente e síndromes com padrão de herança autossômico recessivo de sistemas de reparo do DNA (Ponder, 1990)

Cânceres síndrômicos herdados são aqueles onde a predisposição herdada é fortemente apoiada pelo histórico familiar de ocorrência de cânceres incomuns / raros e além disso ainda exhibe um fenótipo marcador associado (ou seja, apresenta um conjunto de sintomas clínicos, junto ao câncer, que caracteriza a condição de síndrome) tais como retinoblastoma familiar, polipose adenomatosa do cólon familiar e síndromes de múltiplas neoplasias endócrinas. Podemos citar a síndrome de múltiplas neoplasias endócrinas do tipo 2B, onde além do carcinoma medular da tireóide e na medula da adrenal temos neuromas de mucosa, distúrbios do plexo ganglionar autônomo das vísceras, anormalidades ósseas e oftalmológicas.

Cânceres familiares são aqueles onde existe um claro agrupamento familiar do câncer em questão, mas como não existe um marcador associado (por exemplo algum sintoma clínico além do câncer, como no caso anterior) fica bem difícil dizer com certeza se o indivíduo desenvolveu câncer devido à predisposição herdada ou simplesmente pelo acaso. A verdade é que a grande maioria dos cânceres se encontram nesta categoria, porém os mais frequentes são os de mama, ovário, endométrio e colo.

Predisposições herdadas sem agrupamento familiar evidente são aqueles casos em que a predisposição é baixa, resultando em agrupamentos familiares mais raros e mais difíceis de serem detectadas. Como exemplo hipotético, pois ainda não se conseguiu provas concretas deste grupo, teríamos mutações em genes responsáveis pelo metabolismo de agentes carcinogênicos.

E finalmente temos as síndromes com padrão de herança autossômico recessivo de sistemas de reparo do DNA, onde existem danos no DNA por meio dos carcinogênicos, que não são reparados, resultando em várias enfermidades, incluindo câncer. Como exemplo clássico temos o XP - *Xeroderma Pigmentoso*.

O Câncer de mama

1. Incidência

O câncer de mama feminino é um dos maiores problemas médicos com significativas ramificações sociais e de saúde pública. Apesar dos grandes avanços realizados nos últimos 25 anos para entender as naturezas clínica e biológica da doença e diversas mudanças dramáticas no modo de tratá-la, o problema continua persistindo e vem tomando feições cada vez mais complexas. Em 1966, 66.000 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados nos Estados Unidos, com a ocorrência de 29.000 mortes. Por volta de 1975, 88.000 novos casos e 33.000 mortes foram registradas, com a probabilidade de que 1 em cada 14 mulheres iriam desenvolver a doença (Seidman, 1969). As estimativas atuais são de que 1 em cada 10 mulheres irá desenvolver a doença. Numa recente análise feita pelo NIH (*National Institutes of Health*), foi enfatizado que entre os anos de 1990 e 2000 mais de um milhão e meio de mulheres (aproximadamente 150.000 ao ano) dos Estados Unidos irão desenvolver cânceres de mama invasivos e que por volta de 30% destas irão morrer devido ao câncer em si (NIH Consensus Development Conference on Early-Stage Breast Cancer, 1990 apud Franks, 1991). O Brasil, apesar de ser um país do terceiro mundo, apresenta taxa de incidência semelhante a do primeiro mundo, estimada em 65,5 casos para cada 100.000 mulheres por ano (Brasil, Ministério da Saúde, 1993)

Devido a estes valores, o câncer de mama é considerado a doença maligna mais comum entre as mulheres, tanto na Europa e América do Norte como em grande parte da América Latina e Austrália-Ásia (Parkin *et al.*, 1988). Para se ter uma idéia mais precisa, o câncer de mama é responsável por 32% de todos os tipos de cânceres de mulheres norte-americanas e quando comparado aos 14% de câncer colorretal, o segundo tipo mais freqüente, podemos notar a importância epidemiológica desta doença. (Silverberg *et al.*, 1990). Nos Estados Unidos o câncer de mama é detentor do título de segunda causa de morte, devido ao câncer (a primeira causa é o câncer de pulmão, resultado do aumento do consumo de tabaco por mulheres nos últimos tempos). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, em 1989 ocorreram 5491 mortes decorrentes de câncer de mama, número suficiente para situar a doença como a principal causa de morte por neoplasias malignas.

O câncer de mama é de ocorrência extremamente rara em idades inferiores aos 20 anos. A incidência aumenta dramaticamente entre os 25 e 50

anos de idade, após o que continua a aumentar de uma forma mais discreta. Apesar da doença ser incomum entre mulheres adultas jovens (menos de 0,5% ocorre em mulheres com menos de 30 anos e menos que 0,05% em mulheres com idade abaixo dos 25 anos), o câncer de mama ainda é a principal causa de morte por doenças em mulheres entre 25 e 34 anos (nesta faixa a principal causa de morte absoluta são atribuídas aos acidentes e suicídios), enquanto em mulheres entre 35 e 54 anos o câncer de mama passa a ser a principal causa de morte absoluta. (Saracci and Repetto, 1978; Silverberg *et al.*, 1990). Já em mulheres mais idosas, doenças cardiovasculares, câncer de pulmão e câncer colorretal superam o câncer de mama nas causas de morte.

A incidência desta doença tem tido um aumento contínuo nas últimas décadas. (Glass and Hoover, 1990; White *et al.*, 1987) A taxa anual média de crescimento entre os anos de 1980 e 1985 foi de 3%. Este aumento recente nas estatísticas pode ser devido ao uso cada vez mais freqüente de mamografia, que possibilitou a detecção de pequenos cânceres invasivos ou *in situ*. No entanto, este aumento também pode estar associado a novos hábitos, característicos da ativa vida social das grandes metrópoles.

2. Etiologia e fatores de risco

A etiologia do câncer de mama é desconhecida na grande maioria das pacientes, apesar de já existirem determinados fatores de risco que atualmente são associados com a gênese da doença (tabela 1). Entre esses fatores temos o histórico familiar, os endócrino-reprodutivos, fatores ambientais, obesidade e dieta. Note que os fatores de risco, assim denominados, apenas irão associar alguns hábitos e circunstâncias onde se observa uma maior incidência de mulheres afetadas. Estes fatores não determinam, per si, a ocorrência do câncer, e sim um aumento no risco de manifestar a doença, baseado em análises puramente associativas.

Tabela 1: Fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer de mama

<i>Risco de ocorrência de câncer de mama</i>	<i>Fator</i>
<i>Aumento grande</i>	Idade Avançada
	Cultura Ocidental
	Antecedente familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau
	Doenças mamárias benignas, com hiperplasia atípica
	Radiação ionizante
	Antecedente pessoal de câncer de mama
<i>Aumento moderado</i>	Menarca em idade precoce
	Menopausa em idade tardia
	Nuliparidade ou gravidez temporã
	Bom nível sócio-econômico
	Uso frequente de álcool
	Obesidade (apenas em mulheres pós-menopausa)
	Padrão parenquimático presente em mamografias
	Diagnóstico de sarcoma de tecidos moles em filhos
<i>Aumento questionável</i>	Antecedente pessoal de câncer de útero, colo ou ovário
	Contraceptivos orais
	Estrógenos progestágenos na pós-menopausa
	Primeira gravidez interrompida
	Fatores psicossomáticos
<i>Decréscimo</i>	Dieta com altos teores de gordura
	Gravidez levada a termo com idade inferior a 20-24 anos
	Múltiplas gravidezes
	Ooforectomia antes dos 45 anos de idade
	Amamentação
<i>Sem efeito</i>	Tamanho da mama
	Doenças fibrocísticas sem alterações proliferativas
	Uso de tabaco

O histórico familiar é um importante fator de risco, que ainda não foi totalmente esclarecido. Mesmo assim, apesar dos estudos epidemiológicos nesta área ser algo inconsistente (talvez devido ao pequeno número de amostras e à falta de uma metodologia estatística mais apurada para a questão), alguns padrões de herança já foram observados. O aumento do risco está relacionado com a ocorrência do câncer de mama em parentes de primeiro grau (mães, irmãs e filhas), porém é insignificante quanto ao acréscimo de risco quando se trata de parentes em segundo grau dos afetados (Adami *et al.*, 1981; Anderson and Badzioch, 1985; Silverberg *et al.*, 1990). Outros estudos ainda sugerem que os riscos de uma mulher podem variar de acordo com a sua idade e/ou estado menopausal no momento do diagnóstico (será abordado mais adiante) e em relação à lateralidade da doença (uni ou bilateral) nos parentes afetados, este último com uma influência maior que a variável 'estado menopausal'. (tabela 2) (Anderson and Badzioch, 1985; Ottman *et al.*, 1983). A presença da doença em uma ou duas gerações também podem influenciar no risco de ocorrência.

Tabela 2: Riscos de câncer de mama para parentes de primeiro grau devido ao estado menopausal e lateralidade da paciente.

<i>Estado da paciente afetada</i>	<i>Risco para parentes (primeiro grau*)</i>
Pré-menopausal	3,1
Pós-menopausal	1,5
Pré-menopausal e unilateral	1,8
Pré-menopausal e bilateral	8,8
Pós-menopausal e unilateral	1,2
Pós-menopausal e bilateral	4,0

*:irmã, mãe ou filha

Inúmeros estudos têm mostrado uma correlação muito forte entre o estrógeno (hormônio feminino) e o desenvolvimento de câncer de mama. Os fatores que envolvem, então, estes aspectos são denominados endócrino-reprodutivos.

Em experimentos em modelos animais, o estrógeno é requerido para que seja observado a máxima expressão do câncer de mama. A ocorrência do câncer de mama é muito maior em mulheres do que em homens, e ainda, mulheres que sofrem ooforectomia tem reduzido o risco para esta doença. Essa redução é mais efetiva quanto mais jovem a mulher realizar tal operação. Tal redução está na casa dos significativos 70%, para mulheres que fizeram a cirurgia antes dos

35 anos e essa 'proteção' conferida pela ooforectomia persiste além da idade dos 70 anos (MacMahon *et al.*, 1973).

Ainda em relação aos fatores endócrino-reprodutivos, podemos citar a idade de menarca e menopausa, pois estão associados com a extensão total de tempo em que os tecidos mamários estão expostos a níveis fisiológicos de estrógeno, mais especificamente ao número de ciclos menstruais submetidos. Assim, uma mulher que tenha tido uma menarca com idade menor apresentaria um número maior de ciclos acumulados e, portanto, um risco maior (Henderson *et al.*, 1985; MacMahon *et al.*, 1982). Os dados revelam que meninas que tiveram a sua menarca aos 12 anos apresentam um risco duas vezes maior do que aquelas que tiveram a sua menarca com 13 ou mais anos (Pike *et al.*, 1981). E, curiosamente, uma nutrição deficiente atrasando os ciclos menstruais abaixam os riscos de ocorrência da doença (Bernstein *et al.*, 1987). Talvez isso explique as diferenças internacionais nos riscos de câncer de mama devido às diferenças na idade de menarca em decorrência da nutrição.

Além disso também foi observado uma correlação entre o início de ciclos menstruais regulares e a quantidade de atividade física (Bernstein *et al.*, 1987). Assim, o aumento de mulheres com vida sedentária junto a um aumento no número de ciclos ovulatórios durante a adolescência pode estar contribuindo para o aumento de risco de câncer de mama nas grandes metrópoles de países onde as populações se encaixam neste perfil.

Associado à baixa idade de menarca, temos na alta idade de menopausa, o outro ponto do equilíbrio. Afinal, se está em questão o tempo total de exposição ao estrógeno, devemos ponderar também o fim do período ovulatório. Como já era de se esperar, menopausa em idade avançada aumenta os riscos de câncer de mama. Uma mulher que entre em menopausa aos 55 anos apresenta o dobro de risco de uma mulher que entre em menopausa aos 45 anos.

Apesar destas evidências, ainda não se chegou a um consenso sobre terapias e/ou uso de drogas que interferem tanto no ciclo menstrual como nos níveis de estrógeno. Com relação ao uso de anticoncepcionais via oral, as pílulas em geral não aumentam nem diminuem os riscos de câncer de mama (Henderson *et al.*, 1988; Kelsey and Berkowitz, 1988; Pike *et al.*, 1981). Porém, nestes estudos foi observado que alguns subgrupos de mulheres mostraram um aumento significativo de incidência: aquelas que usaram anticoncepcionais por um longo período de tempo ou em uma idade tardia (maior que 45 anos) e aquelas que usaram anticoncepcionais na sua adolescência ou antes da sua primeira gravidez (Olsson *et al.*, 1989; UK National Case-Control Study Group, 1989).

Quanto à questão das terapias envolvendo estrógenos, geralmente utilizados para tratamento dos sintomas da menopausa, existem várias opiniões mas nenhuma conclusiva. Por exemplo, existe uma corrente que defende que o uso deste tipo de terapia reduz sutilmente os riscos da doença (Buring *et al.*, 1987; Dupont *et al.*, 1989); existe uma outra que acredita que esta terapia aumenta os riscos (Bergkvist *et al.*, 1989; Brinton *et al.*, 1986); e finalmente uma terceira que acredita que não exista efeito algum (Kelsey and Berkowitz, 1988).

A maternidade e a idade de uma mulher quando da primeira gravidez (levada a termo) também estão associadas ao risco de desenvolver câncer de mama, que aumenta de acordo com o aumento da idade por ocasião do primeiro parto (MacMahon *et al.*, 1973). A incidência de câncer de mama em mulheres que têm o primeiro parto antes dos 18 anos é cerca de um terço da incidência de mulheres que dão à luz pela primeira vez aos 35 anos ou mais. Curiosamente estas mulheres tem um risco maior do que as mulheres nulíparas.

A incidência de câncer de mama observa um padrão de variação internacional bem definido. As taxas de países ocidentais (norte da América e da Europa) são de 5 a 6 vezes maiores que as taxas de países asiáticos ou africanos. A América Latina e o sul da Europa estão no grupo de risco intermediário. No entanto, nos últimos anos, tem se observado um aumento nas taxas de incidência nestas áreas de baixo risco (Kelsey and Berkowitz, 1988; Miller and Bulbrook, 1986). Estudos clássicos sobre imigrantes japoneses nos Estados Unidos, que tem mostrado um aumento de incidência em gerações subsequentes, sugerindo que o fator ambiental, ao invés do fator genético, é o principal responsável por essas diferenças internacionais bem definidas (Buell, 1973).

Estudos recentes sugerem que estas diferenças podem ser explicadas pelas variações de peso e altura, assim como a idade na menarca e a idade no primeiro parto (Gray *et al.*, 1979). No entanto estes fatores demográficos são, por sua vez, dependente de parâmetros referentes a dieta e a nutrição, que diferem bastante de uma região para outra, resultando em consumos diferenciados (tanto quantitativa quanto qualitativamente) de gordura e proteínas animais.

No entanto a influência da gordura presente na dieta na carcinogênese ainda não foi totalmente esclarecida. Como em todos os outros parâmetros, este também está sob discussão, com grupos defendendo a neutralidade deste fator (Mills *et al.*, 1989; Willett *et al.*, 1987) e outros argumentando de que existe uma tendência ao aumento do risco, quanto maior é a quantidade consumida (Ip

and Ip, 1981; Prentice *et al.*, 1989). Por fim ainda temos um estudo sugerindo que o fator que aumentaria a incidência é a quantidade calórica total, e não a gordura ingerida (Albanes, 1987)

A obesidade, que está relacionada à dieta, está associada ao aumento da incidência de tumores relacionados ao estrógeno, tais como câncer de útero e o próprio câncer de mama. No entanto, os aumentos de risco de câncer de mama relacionados a obesidade foram observados somente em mulheres obesas que estavam no estado pós-menopausal. Essas mulheres apresentam altos níveis de estrógeno, resultantes de uma maior conversão de andrógenos adrenais para estrógenos nos tecidos adiposos. Isso resulta em um maior nível final de estrógenos livres no organismo. (Hershcopf and Bradlow, 1987; Ingram *et al.*, 1989; Prentice *et al.*, 1990)

Por fim, existem grupos que estão tentando explicar o aumento de risco não por um ou outro fator específico, e sim como resultado de um balanço entre todos estes fatores. (Ballard-Barbash *et al.*, 1990; Hershcopf and Bradlow, 1987)

3. Tipos histológicos

Atualmente os estudos morfológicos são realizados tendo como base unidades anatômicas ou estruturais presentes em um órgão. Em uma mama de mulher as tais unidades são constituídas principalmente de ductos e lóbulos, grandes, médios e pequenos, de onde uma variedade de tipos de tumores podem se originar.

Os tumores que se originam do ducto epitelial são encontrados somente no lúmen dos ductos correspondentes, ou seja, estes carcinomas são intraductais e não invadem o estroma subjacente. Com uma frequência maior, estes tumores se originam de ductos maiores e podem assumir várias configurações.

Assim, caso se desenvolvam para dentro do ducto sob forma papilar, são então conhecidos como carcinomas papilares. Este tipo de lesão é raro, sendo responsável por apenas 1% dos cânceres de mama. Histologicamente a membrana basal está intacta e as células ductais epiteliais pleomórficas com polaridade alterada podem ser demonstradas. Esse tipo de carcinoma dificilmente se torna invasivo, ou seja, raramente atinge o estroma subjacente e, clinicamente, os tumores não invasivos são passíveis de serem totalmente removidos. Devido a estas características a sobrevida de pacientes com este tipo

de câncer mamário é maior do que a média da sobrevida, considerando-se todos os tipos existentes.

É interessante notar que os carcinomas não-invasivos são responsáveis por apenas 5% dos cânceres mamários. A variedade não-invasiva de carcinoma, frequentemente referida como carcinoma intraductal ou carcinoma ductal *in situ* (DCIS), consiste em uma proliferação de um subgrupo de células epiteliais confinadas aos ductos mamários sem invasão do estroma, através da membrana basal, características detectáveis pela microscopia óptica.

Um outro tipo de tumor que tem atraído considerável atenção dos pesquisadores é o carcinoma lobular, que se desenvolve a partir dos ductos de calibres menores da mama. O carcinoma lobular *in situ* (variedade não-invasiva) é caracterizado por agrupamentos de pequenas células anaplásicas que se localizam dentro dos lóbulos. Quando este tipo de lesão se estende para além dos limites do lóbulo ou do ducto terminal de onde este se desenvolve, o mesmo passa a se chamar de carcinoma lobular invasivo, impossível de se discernir do carcinoma ductal invasivo convencional.

Os carcinomas ductais invasivos que não apresentam associação com nenhum tipo específico de estrutura histológica são conhecidos como *not otherwise specified* (NOS). Este tipo é o mais comum entre os tumores ductais e por si só representam aproximadamente 80% do total dos casos de câncer de mama. São clinicamente caracterizados pela sua rigidez à palpação, e quando cortados, oferecem uma resistência própria. Regiões de coloração amarelada e consistência arenosa podem ser encontradas e são próprias de tecido necrosado. Frequentemente evoluem para metástases em linfonodos axilares e o seu prognóstico é o mais baixo entre todos os tipos de câncer de mama.

Para completar o quadro das variantes mais comuns, temos os cânceres medulares (5~7% do total dos casos), que se caracterizam como uma lesão circunscrita, que geralmente atinge grandes dimensões e apresenta propriedades infiltrativas e os cânceres mucinosos (ou carcinomas coloidais), responsáveis por aproximadamente 3% dos casos, microscopicamente identificável como um carcinoma ductal que exhibe células epiteliais suspensas em uma matriz mucinosa.

Ainda temos duas manifestações observadas ocasionalmente ao câncer de mama. Uma delas é a doença de Paget, que ocorre de 1% a 4% das pacientes com câncer de mama. Clinicamente a paciente apresenta um histórico relativamente antigo de mudanças eczematódica no mamilo, com ocorrência de prurido, queimação e/ou sangramento. Estas mudanças estão associadas à um carcinoma em um nível abaixo (*underlying*) , podendo ser tanto intraductal

como ductal invasivo. A outra se trata de câncer de mama inflamatório e é caracterizada clinicamente por vermelhidão e aquecimento (*warmth*) epitelial local e o enrijecimento da mama. Quando neste estado, muitas pacientes já exibem um quadro avançado, incluindo nódulos axilares palpáveis, nódulos supraclaviculares e/ou metástases distantes.

Tabela 3: Incidência de diferentes tipos histológicos em câncer de mama invasivo (Fisher *et al.*, 1975)

<i>Tipo Histológico</i>	<i>Número de pacientes</i>	<i>%</i>
• Um único tipo		
Ductal Invasivo NOS	526	52,6
Medular	62	6,2
Lobular Invasivo	49	4,9
Mucinoso	24	2,4
Tubular	12	1,2
Adenocístico	4	0,4
Papilar	3	0,3
Carcinosarcoma	1	0,1
• Ductal Invasivo NOS em combinação com outros tipos	280	28,0
• Outras combinações, SEM o tipo Ductal Invasivo NOS	16	1,6
• Doença de Paget	23	2,3
<i>Total</i>	1000	100,0

4. Estadiamento

O estadiamento clínico-cirúrgico do câncer e a confirmação detalhada de seu tipo e características histológicas são indispensáveis para o planejamento terapêutico adequado e previsão prognóstica segura, além de permitir classificar a extensão anatômica da doença. Isto é um ponto relativamente importante quando levamos em consideração os tipos histológicos envolvidos nestas doenças. Um diagnóstico correto nos permite correlacionar o estágio em que o tumor se encontra com as mudanças que eventualmente ocorrem no seu genoma.

Para tanto é utilizado o sistema TNM, que foi introduzido após longos estudos pela UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) (UICC, 1989), sendo continuamente atualizado. Este sistema representa a forma mais eficiente e padronizada para classificação de tumores. Hoje universalmente aceito e adotado, a criação deste sistema visou terminar com a confusão vigente no estudo dos estadios, a medida que novas técnicas foram criadas para explorações anatômicas locais e foram descritos mais e mais locais onde se encontravam os tumores.

Então, para descrever a extensão anatômica da doença, o sistema TNM está baseado na pesquisa de três componentes:

T - a extensão do tumor primário.

N - a ausência ou a presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais.

M - a ausência ou a presença de metástase a distância.

A adição de números a esses três componentes indica a extensão da doença maligna. No caso específico do câncer de mama a classificação aplica-se somente aos carcinomas e deve-se proceder a confirmação histológica da doença. Se o paciente apresentar tumores múltiplos simultâneos em uma mama, o tumor de categoria T maior deve ser considerado para classificação. Cânceres bilaterais simultâneos da mama devem ser classificados independentemente.

T - Tumor primário

Tx - O tumor primário não pôde ser avaliado.

T0 - Não há evidências de tumor primário.

Tis - Carcinoma *in situ*: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular *in situ* (ou ainda Doença de Paget do mamilo, sem tumor associado).

T1 - Tumor com até 2 cm em sua maior dimensão.

T1a - até 0,5 cm em sua maior dimensão.

T1b - de 0,5 a 1,0 cm em sua maior dimensão.

T1c - de 1,0 a 2,0 cm em sua maior dimensão.

T2 - Tumor medindo entre 2,0 e 5,0 cm em sua maior dimensão.

T3 - Tumor maior que 5,0 cm em sua maior extensão.

T4 - Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele. (Nota: parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serratio anterior. Não inclui músculo peitoral.)

T4a - extensão à parede torácica.

T4b - edema (inclusive “*peau d’orange*”), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites, limitados à mesma mama.

T4c - apresenta ao mesmo tempo os sintomas de 4a e 4b.

T4d - carcinoma inflamatório.

(Nota 1: o carcinoma inflamatório de mama é caracterizado por um endurecimento difuso e intenso da pele com borda erisipelóide, geralmente sem massa palpável subjacente. Se a biópsia da pele for negativa e não existir tumor primário localizado mensurável, o carcinoma inflamatório clínico (T4d) é classificado histopatologicamente como pTx.

Nota 2: a retração de pele, mamilo ou outras alterações cutâneas, exceto T4b e T4d, podem ocorrer em T1, T2 e T3 sem afetar a classificação.)

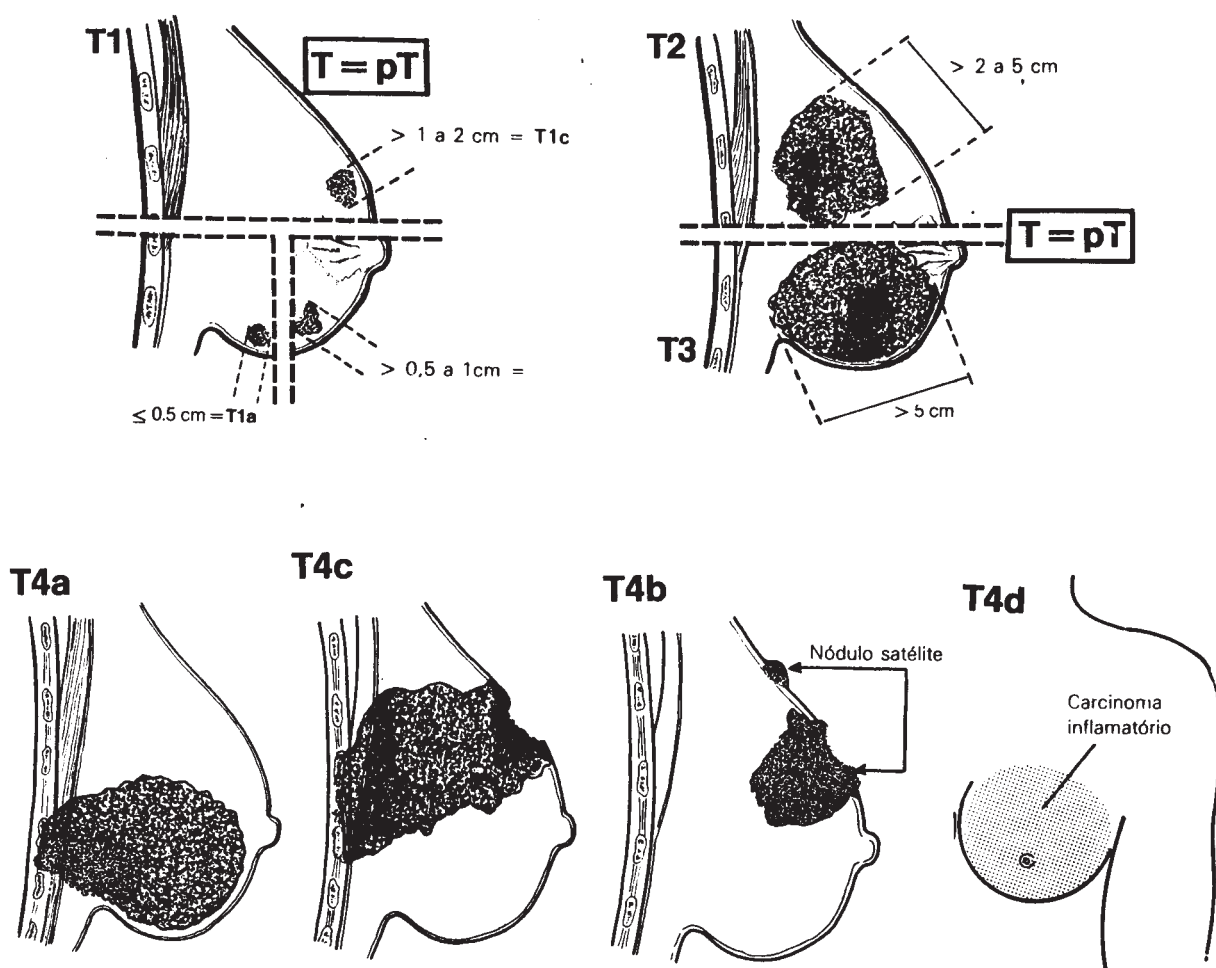


Figura 1: Esquemas dos vários níveis de estadiamento do tumor primário, pelo sistema TNM.

N - Linfonodos regionais

Nx - Linfonodos regionais não podem ser avaliados (previamente removidos, por exemplo).

N0 - Ausência de metástase em linfonodo regional.

N1 - Metástase em linfonodo(s) ipsilateral(ais) móvel(eis).

N2 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es) ipsilateral(ais) fixos uns aos outros ou a outras estruturas.

N3 - Metástase em linfonodo(s) da cadeia mamária interna ipsilateral.

M - Metástases a distância

M0 - Ausência de metástase(s) a distância.

M1 - Presença de metástase(s) a distância.

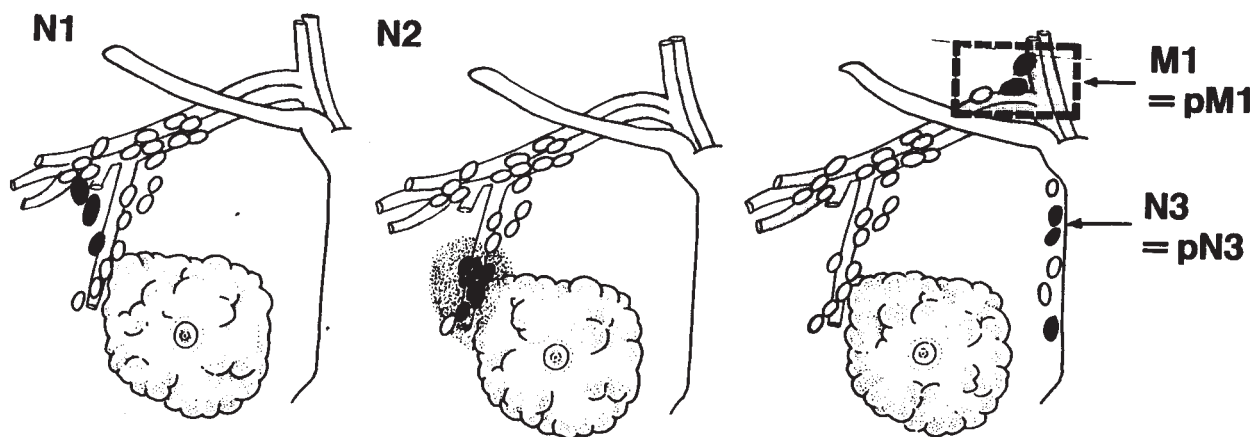


Figura 2: Esquemas das classificações dos linfonodos regionais e metástases a distância, pelo sistema TNM.

Bases Genéticas do Câncer de Mama

BRCA1 e BRCA2

Ao verificarem a inconstância na ocorrência de fatores que predispõe ao câncer de mama, os pesquisadores tomaram um novo rumo. Com o atual estágio de desenvolvimento da genética, novas propostas de pesquisas surgiram, de forma a tentar entender melhor a doença através desta óptica. Assim começou uma nova corrida para se determinar o gene responsável por esta enfermidade.

Como já foi dito anteriormente, o câncer é basicamente uma doença genética. Com base nesta suposição, os pesquisadores tentaram inicialmente encontrar um gene específico responsável pela predisposição ao câncer de mama nos indivíduos portadores. É interessante notar que o gene pode ser do tipo proto-oncogene tanto quanto supressores de tumor. Porém, como essa definição depende da identificação do gene e de sua atividade, o mesmo foi arbitrariamente batizado de BRCA1 (referente ao primeiro gene a ser clonado, responsável por câncer de mama), mesmo antes de ter sido descrito.

Deve-se ter em mente de que a incidência de câncer de mama devido exclusivamente a fatores hereditários está na faixa dos 5% do total dos casos. Porém quando consideramos apenas os casos diagnosticados antes dos 30 anos de idade, verificamos 25% destas pacientes estão doentes devidos aos fatores hereditários (Claus *et al.*, 1991).

A princípio, os cânceres de mama foram subdivididos em duas categorias: os de incidência precoce e os de incidência tardia, baseadas na inflexão da faixa dos 50 anos que existe na curva de incidência por idade. Dessa maneira, acreditava-se que o BRCA1 seria responsável por 45% dos casos hereditários, e aproximadamente 80% dos casos em famílias com altas incidências precoces de câncer de mama e ovário.

Assim, graças aos intensos esforços das equipes de pesquisa, conseguiu-se, em 1990, mapear o BRCA1 no braço longo do cromossomo 17 (Hall, 1990; Narod *et al.*, 1991). Um pouco mais tarde, em 1993, uma localização mais precisa foi determinada em uma região de 1 ~ 2 megabases do cromossomo 17, seguido de uma região de apenas 600 Kb, em 17q21 (Bowcock, 1993; Simard *et al.*, 1993).

A clonagem do gene deu-se logo em seguida, em outubro de 1994, graças a uma família que portava uma mutação, resultando em mudança no quadro de leitura. A partir desta mutação várias outras foram identificadas no

mesmo gene, mostrando associação direta com a doença. Neste estudo foi sugerido que a proteína codificada pelo gene BRCA1 poderia conter uma sequência, próxima ao terminal amino, que mostra uma similaridade a domínios do tipo *zinc-finger*. (Miki *et al.*, 1994) Tais domínios levam este nome por exibirem seqüências de aminoácidos que tomam formato de digitações contendo na sua base um átomo de zinco. Este tipo de estrutura está associada a proteínas regulatórias (do tipo DNA *binding proteins*) que se ligam diretamente ao DNA através dessas digitações. As mais características são os fatores de transcrição, que contém este domínio, e que o utilizam para se ligar em seqüências específicas de DNA, ativando assim a sua transcrição. Isso condiz com a teoria de que o produto do BRCA1 é uma proteína do tipo supressora de tumor (ou seja, uma proteína que age como uma reguladora negativa do crescimento), uma vez que para exercer a atividade reguladora, uma proteína precisa interagir com o DNA.

No entanto, mesmo com a descrição deste gene, ainda haviam casos de câncer de mama familiar onde não se detectou mudança nenhuma no BRCA1, principalmente em famílias onde havia pelo menos um caso de câncer de mama masculino (Stratton *et al.*, 1994). Isso significava que deveria existir um outro gene, que conferia um risco maior ao câncer de mama masculino do que o BRCA1.

Utilizando-se de estudos de ligação, conseguiu-se, em uma primeira instância, delimitar o gene BRCA2 em um intervalo de 6 cM, no cromossomo 13q12-13 (Wooster, *et al.*, 1994). E finalmente, no final de 1995, através de técnicas de clonagem posicional, chegou-se ao gene do BRCA2 (Wooster, *et al.*, 1995). Uma vez clonado, este novo gene apresentou interessantes características, muito semelhantes ao do gene BRCA1, tais como não apresentar significativa similaridade ao qualquer outra proteína já descrita e por apresentar um alto nível de transcritos nos testículos, apesar de ser de expressão constitucional (Tavtigian, *et al.*, 1996).

Dados formais sobre os riscos conferidos por mutações no gene BRCA2 ainda não foram divulgados, no entanto, análises revelaram que o risco de incidência de câncer de mama feminino conferido tem um valor bem próximo aos valores do BRCA1. No caso do câncer de mama masculino, mutações neste gene representam um aumento de risco de 200 vezes, um valor consideravelmente maior do que o conferido pelo BRCA1 (Stratton, 1996).

Estes dados logo levantaram uma polêmica quanto à necessidade de realizar um exame para localizar BRCA1 e BRCA2 mutantes em todas as mulheres. A cerne da questão está no problema de se preservar a privacidade e

os direitos de cada um perante a ciência do estado de cada indivíduo. Em outras palavras, companhias de seguro podem se recusar a aceitar uma mulher que tenha o BRCA1 ou BRCA2 mutado como cliente, ou mesmo sofrer retaliações no ambiente profissional. Além de tudo, já foi verificado a ocorrência de mulheres com até 80 anos que tinha o seu BRCA1 mutado e que ainda não manifestaram o câncer de mama (Nowak, 1994). Por fim ainda resta a questão da validade do teste, quando o mesmo prevê uma chance de 85% de manifestar uma doença para a qual não existe cura e o máximo que se pode recomendar é levar uma vida de acordo com determinados hábitos, tampouco definitivos, que diminuiriam as chances de manifestação.

Após o entusiasmo inicial, como ainda não havia maneira de se avaliar o envolvimento do BRCA1 e BRCA2 em outros cânceres de mama (casos esporádicos, por exemplo), os pesquisadores começaram a testar este gene em casos não-familiares.

Para a surpresa e decepção geral, estes testes falharam e em praticamente todos os casos esporádicos não se verificou, de maneira alguma, mutações no BRCA1. Isso significa que a grande maioria dos casos ainda permanecem inexplicáveis do ponto de vista genético, e que maiores esforços devem ser aplicados para tentar desvendar os processos de tumorigenese do câncer de mama esporádico, que contam com 90 ~ 95% dos casos atuais (Stratton, 1996).

Microsatélites

No genoma eucariótico encontramos muitas seqüências que não apresentam função codificante, ou seja, não fazem parte da porção transcrita de nenhum gene em particular. Constituintes da maioria do DNA total do organismo, estas seqüências parecem, a primeira vista, não serem dotadas de nenhuma importância, tanto que costumava-se usar o termo '*junk DNA*', ou seja, DNA lixo, para designá-las de uma forma genérica.

Análises mais atuais verificaram que elas não são tão inúteis quanto se imaginavam, fazendo parte em unidades de transcrição como regiões flangeadoras não-traduzidas do RNA mensageiro ou como íntrons que são removidos durante a maturação de mRNAs. Além de participarem de unidades de transcrição, elas podem também prover sinais e sítios específicos que participam de vários processos celulares, tais como promotores de transcrição, origens de replicação de DNA, sítios para dobras do cromossomo, pontos de ligação de quinetoplastos, entre outros. Até o presente momento apenas poucas

destas seqüências foram caracterizadas visando correlacionar a seqüência à sua função específica (tais como alguns promotores e *enhancers*).

Uma porção significativa destas seqüências não-codificantes consiste de DNA repetitivo, sob forma de curtas seqüências que são repetidas e idênticas, distribuídas ao longo do genoma. Estas seqüências repetitivas são geralmente encontradas fora de regiões codificantes e, portanto, candidatas às várias funções descritas anteriormente. No momento temos duas principais classes: os DNAs moderadamente repetitivos e os DNAs altamente repetitivos. A diferença principal está no fato da primeira classe apresentar-se como seqüências de repetições de tamanhos variados, agrupadas em famílias, e se distribuem de uma forma mais ou menos regular, entre porções maiores de DNA não-repetitivo. Já a segunda classe é constituída de várias seqüências repetidas muito curtas, dispostas em tandem (ou seja, uma do lado da outra), sob a forma de um agrupamento (*cluster*) relativamente grande. Este tipo de componente está presente na grande maioria de todos os genomas eucarióticos superiores, porém a sua quantidade total é extremamente variável de um organismo para outro.

Em alguns casos estas seqüências curtas que estão dispostas em tandem em DNAs altamente repetitivos são idênticas umas às outras. Devido a este fato, este tipo de repetições geralmente cria uma fração com propriedades físicas distintas do resto do DNA. Uma das principais propriedades é a diferença na composição de bases em relação à composição média do genoma, que permitirá diferenciá-los quando submetidos a fracionamento por densidade.

Assim, quando DNA genômico eucariótico é centrifugado em um gradiente de densidade (de cloreto de cério, por exemplo) teremos duas bandas, contendo dois tipos de materiais distintos: a primeira banda, chamada de banda principal, é constituída pela maioria do genoma e tem uma densidade característica, determinada pela média do conteúdo de G+C. Em adição à esta banda principal temos uma banda mais fraca e menor, com uma constituição média de C+G diferente da média do genoma. Este segundo material, por estar sempre associado a banda principal nesse tipo de experimento, foi denominado de DNA satélite e a maioria do DNA altamente repetitivo de um genoma pode ser isolada dessa maneira (Lewin, 1994)

Atualmente, após análise desses DNAs altamente repetitivos através de seqüenciamento, observou-se que as repetições curtas tinham um mote de mono, di, tri ou tetra nucleotídeos. Devido ao seu pequeníssimo tamanho e levando-se em conta o termo "DNA satélite", estas repetições foram denominadas "*Microsatellite Repeats*" (repetições de microsátélites).

Os microsátélites ainda exibem outras características bem interessantes. Como já foi dito anteriormente, tais repetições estão amplamente distribuídas pelo genoma. Para se ter uma noção da concentração destes microsátélites, em humanos, uma determinada classe de microsátélite (mote CA, com pelo menos 10 repetições) é encontrada a cada 30-60 Kb, resultando em aproximadamente 100.000 ocorrências desta classe de microsátélite (Weber and May, 1989; Litt and Luty, 1989)

No caso específico do genoma humano, tais repetições são constantes com relação às suas localizações, mas altamente variáveis em quantidade de repetições que cada *locus* carrega. Em outras palavras: temos bem caracterizada a localização de vários *loci* de microsátélites, incluindo o mote de nucleotídeos em repetição de cada *locus*, no entanto o número de repetições de cada mote em cada *locus* de microsátélite é altamente variável de indivíduo para indivíduo.

Sugriu-se então que estas diferenças seriam resultantes de trocas desiguais de DNA durante a mitose ou meiose (*crossing-over* desigual - Fig. 3). Além dessas diferenças individuais, estudos mais recentes mostraram que a etnia do indivíduo também está envolvida com a ocorrência de certos *loci* de microsátélite nos diferentes indivíduos, sendo alguns alelos mais freqüentes em certas raças do que em outras (Sommer *et al.*, 1994), chegando mesmo a existir alelos raça-específicos. Logo em seguida, estas características dos microsátélites começaram a ser empregadas de uma forma mais prática e sistemática.

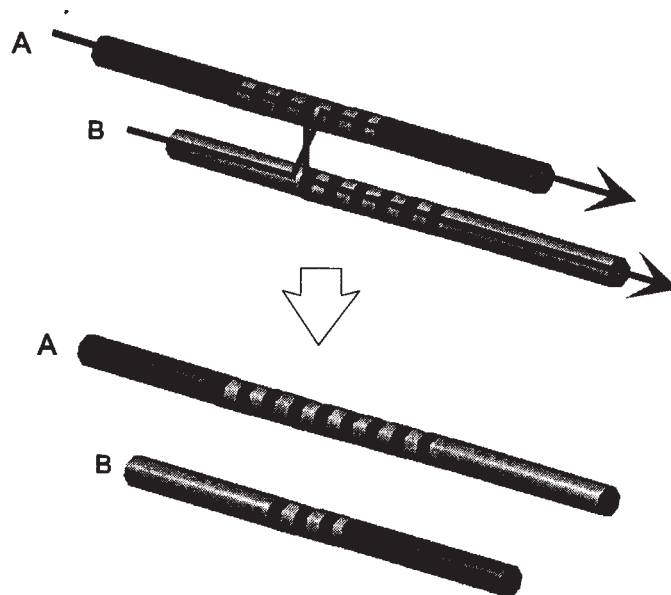


Figura 3: Crossing-over desigual gerando alterações de tamanho.

Primeiras Aplicações

Até a metade da década de 80, as análises de polimorfismos do DNA se baseavam praticamente em sondas específicas para detectar diferentes fragmentos de DNA de tamanhos variados (RFLP), resultantes de digestão com enzimas de restrição. Esta metodologia mostrou-se relativamente ineficiente, em particular nos casos de identificação humana, pois sempre dependiam de mudanças muito sutis e nem sempre presentes nos fragmentos de interesse, limitando muitíssimo os *loci* que poderiam ser estudados. Além disso, apresentavam mais uma limitação: os RFLPs geralmente mostram resultados dimórficos (presença ou ausência de sítios de restrição), com a heterozigosidade determinada pelas frequências alélicas, que nunca excederiam os 50% (geralmente estando em um valor bem mais baixo).

Então, em 1985, Jeffreys sugeriu que as análises genéticas humanas poderiam ser simplificadas se a sonda utilizada reconhecesse um *locus* de natureza hipervariável, com grande variação multialélica e uma heterozigosidade correspondentemente alta. *Loci* hipervariáveis seriam regiões de microsátélites, onde o polimorfismo seria resultante de diferenças alélicas no número de repetições do mote. Dessa maneira, as variações de tamanho resultantes podem ser detectadas usando-se qualquer enzima de restrição que não clive a região repetitiva (a região deve ficar *entre* dois sítios de restrição, isto é, *dentro* do fragmento gerado) conjuntamente com a sonda que detecte este microsátélite. É interessante notar que os marcadores gerados dessa maneira são, a princípio, estáveis e herdados de modo mendeliano.

Estes marcadores foram inicialmente usados para se determinar, pela primeira vez, um DNA *fingerprinting* (Jeffreys *et al.*, 1985), baseado na utilização de uma sonda com um mote comum a vários *loci* do genoma. Como os microsátélites são altamente variáveis de indivíduo para indivíduo e herdados de modo mendeliano, cada um de nós apresenta uma combinação resultante dos cromossomos parentais que recebeu. Este tipo de identificação é virtualmente inequívoco e indica com precisão cada indivíduo que carrega um padrão específico.

A princípio esta metodologia parecia ser uma ferramenta extremamente útil na medicina forense, devido a sua precisão; porém a mesma exige uma quantidade relativamente grande de DNA para que se possa realizar a digestão e transferência para uma membrana em experimentos de hibridização. A quantidade de DNA requerida nem sempre está disponível no local do crime e muitas vezes o material coletado já se encontra em estado de degradação

avançada, impossibilitando a sua utilização. Com base nestes quesitos, necessários para que o método possa ser útil, Jeffreys propôs, em 1988, a utilização de técnicas de PCR para se amplificar pequenas quantidades de DNA deixadas no local do crime, provenientes de gotas de sangue, restos de espermatozoides ou raízes de cabelo (Jeffreys *et al.*, 1988).

A metodologia resume-se na amplificação de vários *loci* de microsatélites previamente conhecidos, utilizando *primers* específicos para cada *locus*. As seqüências de microsatélites, assim amplificadas, podem ser analisadas pela hibridização com sondas específicas.

Instabilidade de Microsatélites

Como já foi dito anteriormente, seqüências de microsatélites apresentam grande variação na quantidade de repetições presentes em cada *locus*, e diversos mecanismos tem sido sugeridos para a origem dessa variação. Porém nada havia ainda sido proposto quanto a uma possível associação desse fenômeno com uma determinada patologia. Na verdade, até o final da década de 80 estas seqüências de microsatélites não passavam de mera curiosidade com poucos propósitos de real utilidade, como é o caso das técnicas de *fingerprinting*.

Entretanto, no início da década de 90, algumas doenças começaram a ser esclarecidas, tendo seus genes clonados e devidamente analisados. Para a surpresa dos pesquisadores, várias delas apresentavam uma característica em comum: os genes alterados (ou mutantes) não diferiam dos genes normais em nada, exceto quanto ao número de repetições dos motivos de microsatélites encontrados no gene, seja dentro da região codificante (exons), seja fora destas (introns). Esta variação no número de repetições refletia o fato das seqüências não serem estáveis. Além disso, quando o microsatélite está envolvido em alguma função transcricional (seja participando como seqüência codificante, seja como seqüências necessárias à perfeita regulação da expressão), a variação no número de repetições pode comprometer de maneira séria o equilíbrio necessário para a manutenção de funções específicas.

A partir destas descobertas, começaram a ser sugeridas várias hipóteses para se explicar estas variações no número de repetições. A mais aceita pelos pesquisadores atualmente é o modelo de mutação dinâmica (Richards and Sutherland, 1992) ou *slipping replication*.

Slipping replication ou mutação dinâmica são dois termos cunhados para se designar um mesmo modelo que tenta explicar as variações no número de repetições de microsátélites. Como já foi anteriormente explicado, os microsátélites são constituídos por motes que se repetem em tandem, ou seja, um seguido de outro. Uma vez que estão nesta disposição, os nucleotídeos complementares a estas seqüências também estão repetidos e em tandem, porém com um mote complementar à outra fita. Isso possibilita o pareamento de uma repetição com quaisquer das repetições complementares da outra fita (Fig. 4) - é o que define o termo *slipping* do modelo - as fitas tem, potencialmente, capacidade de 'escorregar'/'deslizar' e se parar com a próxima seqüência complementar que encontrar para garantir a estabilidade das duas fitas.

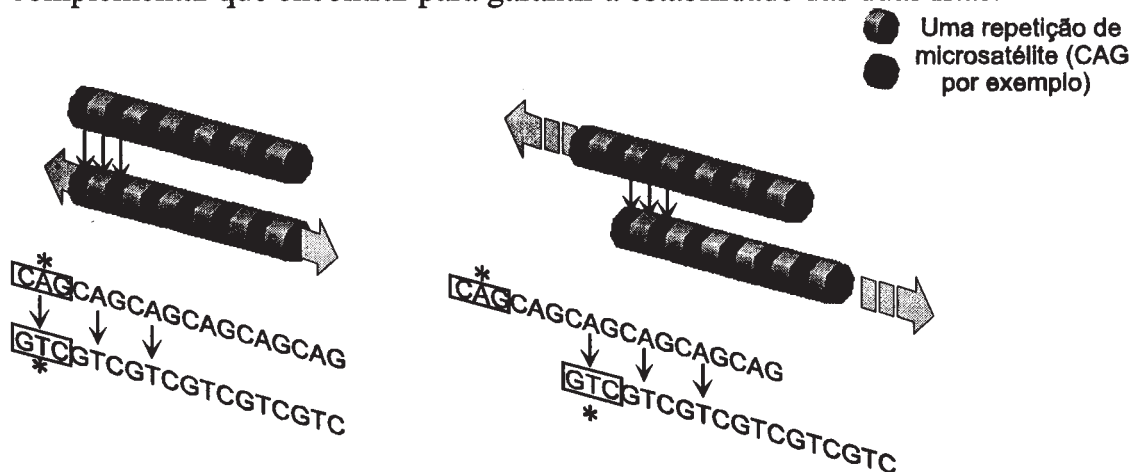


Figura 4: Queda de especificidade e 'deslizamento' das seqüências de microsátélite.

A primeira impressão é a de que este mecanismo é extremamente comum de ocorrer e que toda a estabilidade do genoma estaria comprometida, se levarmos em conta o fato de que seqüências de microsátélites estão presentes em um número considerável. Porém estas variações não são comuns de serem encontradas em células normais, pois existem algumas condições que impedem a sua ocorrência.

A primeira é o simples fato destas seqüências não estarem livres e soltas pelo genoma. Flanqueando os microsátélites existem seqüências específicas e complementares que não estão sujeitas aos 'deslizamentos', constituindo a grande maioria das seqüências do genoma. Assim, por estarem ligados a estas seqüências, os microsátélites estão virtualmente presos às suas posições. (Fig. 5).



Figura 5: Sequências flanqueadoras impedem 'deslizamento'.

No entanto existe uma etapa do ciclo celular onde esta restrição não está presente: durante a replicação do DNA (de onde se origina o termo '*replication*'). É exatamente nesta fase onde acontecerá a amplificação ou redução das seqüências repetidas.

Durante a duplicação temos a participação de enzimas que realizam a polimerização da fita complementar, que normalmente ocorre somente no sentido 5'→3'. Quando a duplicação se inicia, é formada a bolha de replicação que vai avançando em apenas uma direção. Este processo, onde ocorre desnaturação das duas fitas, por ser direcional, vai expor as fitas molde em dois sentidos: em uma delas a desnaturação vai ocorrendo no sentido 5'→3', enquanto na outra ocorre no sentido 3'→5' (Fig. 6). Como a polimerase só tem a capacidade de síntese 5'→3', a solução encontrada pela natureza foi a polimerização contínua de uma das fitas, junto com a síntese descontínua da outra fita na forma de vários fragmentos curtos e independentes, chamados de fragmentos de Okazaki, em homenagem ao seu descobridor (Fig. 7). Tais fragmentos são, logo após a síntese, ligados entre si através de ligases presentes nas duplicações.

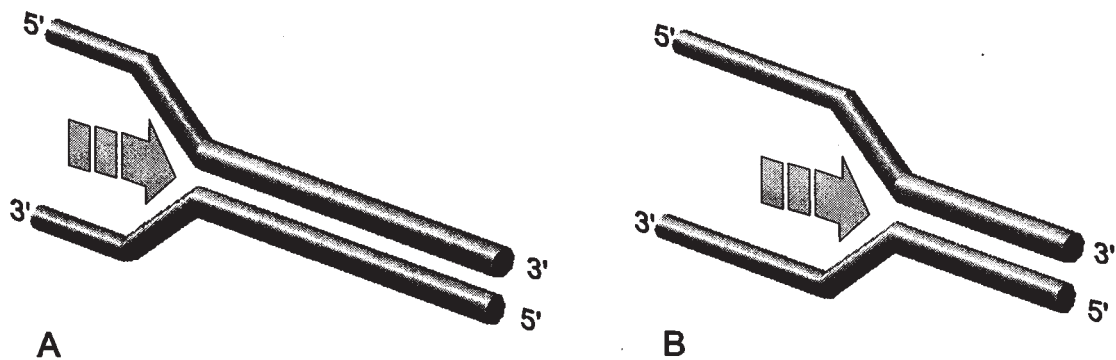


Figura 6: Desnaturação das fitas molde.

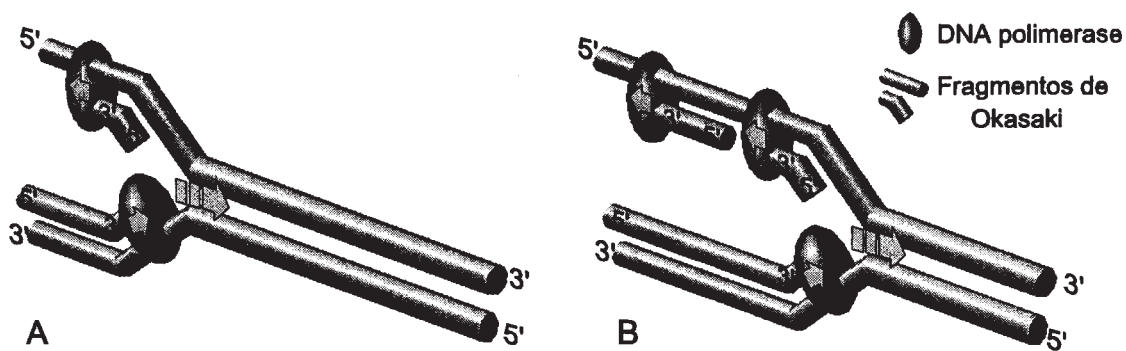


Figura 7: Fragmentos de Okazaki.

Quando o processo de duplicação atinge uma região de microsatélites, inevitavelmente serão criados fragmentos de Okazaki contendo seqüências repetidas. Dependendo do tamanho do microsatélite (número de repetições), podemos ter fragmentos inteiros com os motes repetidos e sem uma ou ambas as seqüências flanqueadoras que impediam o seu deslocamento. Assim, quando ocorre uma queda na especificidade de ligação do DNA sintetizado e o DNA molde, o fragmento pode, pelas seqüências repetidas, deslocar-se do local exato da ligação e se parear com outra seqüência repetida presente na fita complementar (Fig. 8).

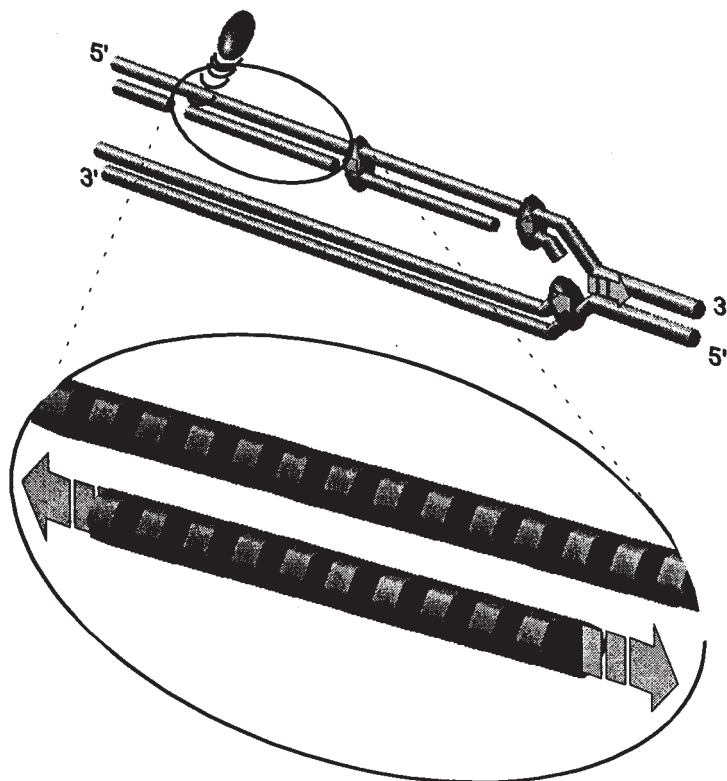


Figura 8: 'Deslizamento' de seqüências de microsatélites durante a replicação.

Para entendermos melhor, é necessário analisarmos este processo de modo dinâmico. Durante a síntese do fragmento, este pode apresentar uma queda na especificidade e se parear em outra repetição, formando uma alça (Fig. 9b.). No entanto a síntese prossegue e acaba por preencher o vazio que ficou por sintetizar, de tamanho correspondente à alça formada, em número de nucleotídeos (Fig. 9c.). Como podemos ver, a quantidade de repetições na fita sintetizada tornou-se maior. A fase final para que este processo se complete está em sistemas de reparo das células. Ao perceber uma incoerência no DNA, o sistema de reparo ordinário conseguirá localizar, mas não caracterizar a anomalia. Desta maneira, o sistema escolherá, arbitrariamente, uma das fitas para ser usada como molde para o reparo. Caso a fita escolhida seja a com seqüências aumentadas, teremos a efetivação deste mecanismo, resultando em aumento do número de repetições de microsatélites (Fig. 10a~10e). Da mesma maneira que isso ocorre, também existe diminuição de quantidade de repetições de microsatélites. Este processo é semelhante ao descrito, com a diferença da alça ser formada estar na fita molde, seguido de clivagem desta alça pelo sistema de reparo, deletando-as, resultando na diminuição.

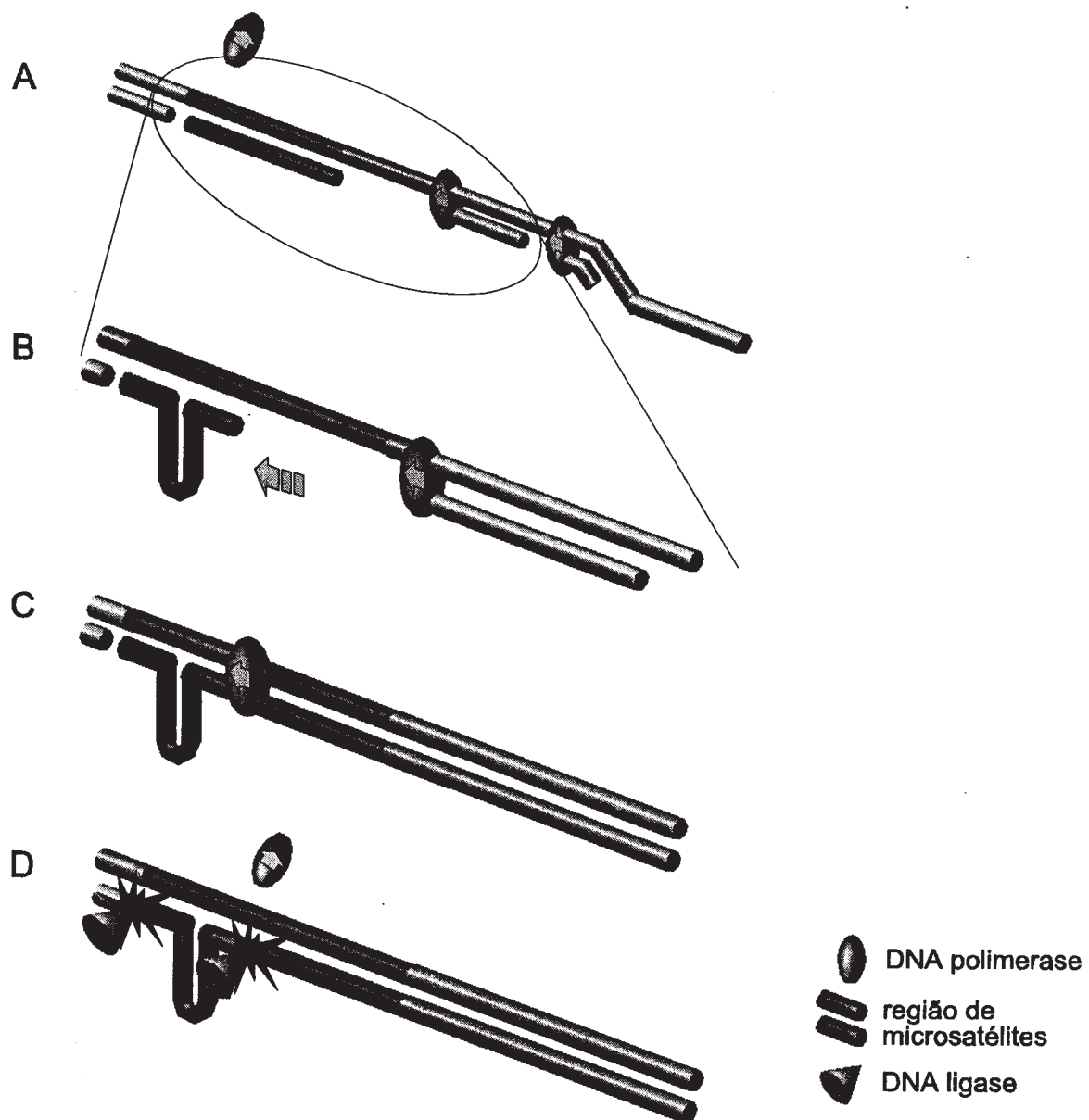


Figura 9: Mecanismo de mutação dinâmica (parte 1). **A:** região de microsatélite sem seqüências flanqueadoras, logo após a síntese. **B:** queda de especificidade e consequente 'deslizamento' - formação de alça. **C:** DNA polimerase do fragmento posterior continua a síntese, tomando por molde o DNA simples fita deixado pela formação da alça. **D:** finalização e atuação da DNA ligase.

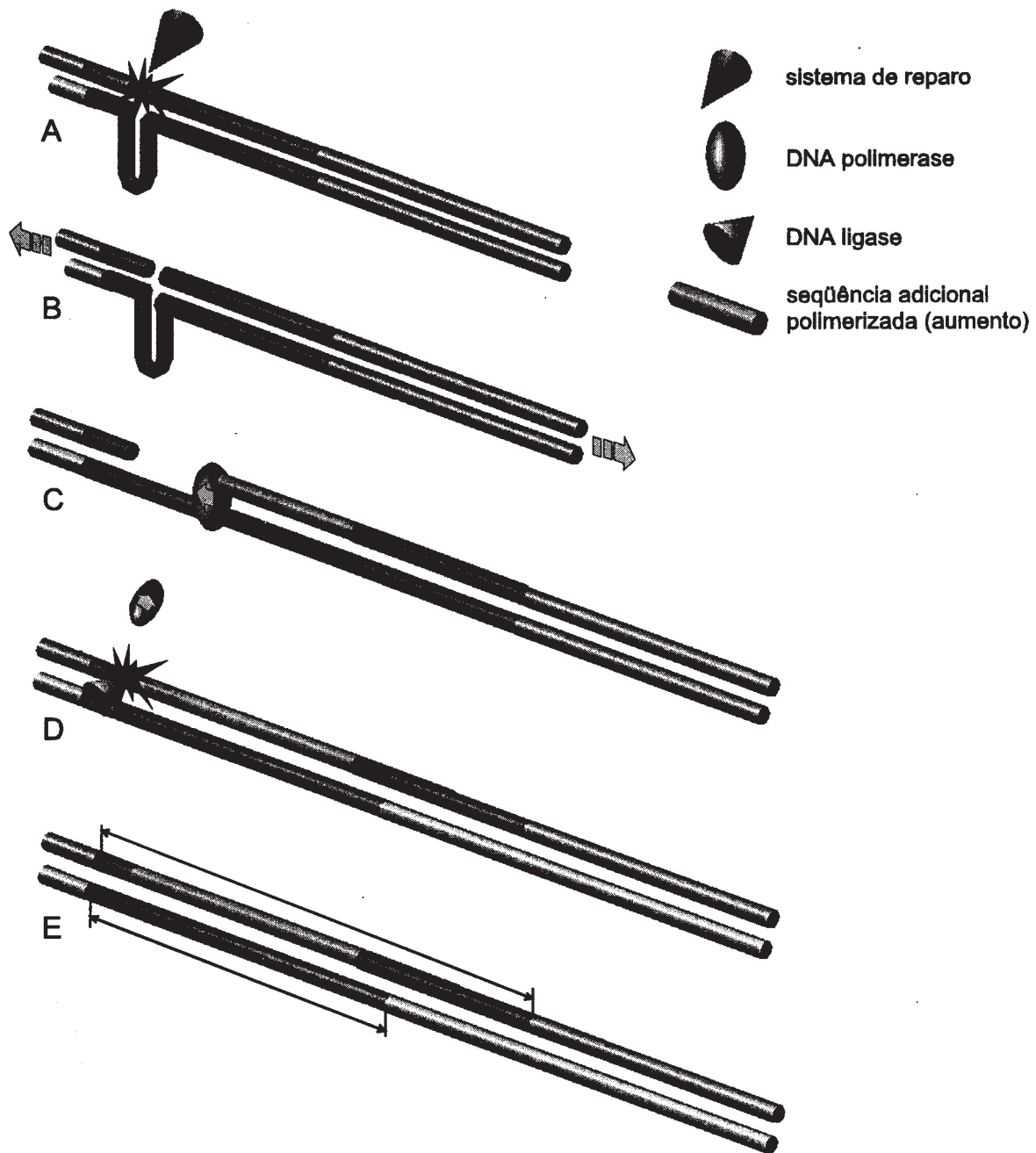


Figura 10: Mecanismo de mutação dinâmica (parte 2). **A:** sistema de reparo celular cliva a fita sem alça. **B:** relinearização da alça e consequente deslocamento das fitas. **C:** DNA polimerase, atuando no processo de reparo, sintetiza nova fita de DNA para preencher a lacuna. **D:** DNA ligase, atuando no processo de reparo, finaliza a operação. **E:** Aumento resultante do processo de mutação dinâmica.

Assim, como podemos ver, a mutação dinâmica ou *slipping replication* é um processo extremamente verossímil e simples, e, lembrando que todas as células são provenientes de replicações, podemos imaginar que o mesmo seja extremamente comum. Dados recentes nos mostram que a taxa de mutação para *loci* de microsatélites estão na casa de 10^{-4} e 10^{-5} por divisão em células de mamíferos (Strand *et al.*, 1993).

Doenças Correlacionadas

A partir de então todas as atenções da genética médica começaram a se voltar para as seqüências de microsatélites, com a esperança de poderem explicar várias doenças de origem claramente gênica, mas ainda não compreendidas.

Entre as primeiras doenças descritas estão o síndrome do X frágil, a distrofia miotônica, a ataxia espino-cerebelar do tipo 1 e a coreia de Huntington. É interessante notar que as três últimas são doenças degenerativas do sistema nervoso e que apresentam um mesmo mote de repetição.

A síndrome do X frágil é a segunda causa de retardo mental devido a fatores genéticos (sendo o síndrome de Down a primeira), tendo sido inicialmente descrito por Martin e Bell, em 1943 (daí o outro nome da síndrome) (Davies, 1989). Os pacientes não apresentam um fenótipo típico discriminante muito marcante e muitas vezes apenas o especialista consegue distingui-los pelas características faciais. Entre as diferenças podemos citar um moderado retardo mental, uma face alongada com orelhas grandes e protuberantes e um macroorquidismo. Porém a mais evidente característica está na análise citológica destes pacientes que apresentam uma região instável na parte terminal do braço longo do cromossomo X, conhecida como sítio frágil (daí a denominação da doença).

Nesta doença, a primeira a ser descrita onde o fator responsável é a instabilidade de microsatélites, existe expansão de repetições do trinucleotídeo CGG. Esta seqüência de microsatélites encontra-se na região 5' não traduzida do primeiro exon do gene FMR1, levando à hipermetilação da região promotora e a conseqüente extinção da expressão gênica (Eichler *et al.*, 1994).

A distrofia miotônica é a forma mais comum de distrofias musculares em adultos, com uma incidência de 1 em 8000 nascimentos (Harper, 1989). Esta doença é caracterizada pelo enfraquecimento progressivo dos músculos,

particularmente em extremidades distais, cabeça e pescoço, acompanhado e freqüentemente precedido por uma miotonia, que confere às mãos tremor e dificuldade para abrir a palma. Há formação de cataratas, ptose palpebral e uma inexpressividade facial característica. Os sintomas costumam aparecer no início da vida adulta, apesar de que sinais sutis podem ser detectados mais precocemente. Ocasionalmente uma criança afetada pode apresentar os sintomas plenos da doença e uma grave deficiência mental. Um fato interessante (e que voltará a se repetir em algumas outras doenças envolvendo microsátélites) é que curiosamente, quando ocorre a forma juvenil da doença, esta invariavelmente foi herdada da mãe (Hauge and Litt, 1993).

O microsátélite envolvido nesta doença é composto pelo mote CAG e se localiza em um região não traduzida, de um gene de proteína quinase ainda não caracterizada quanto ao seu papel no desenvolvimento da enfermidade (Brunner *et al.*, 1993). A quantidade de repetições está diretamente ligada ao fenótipo clínico e à idade de manifestação dos primeiros sintomas: quanto mais repetições tiver, mais grave serão os sintomas e mais cedo irão aparecer. Um indivíduo normal não apresenta mais que 40 repetições, enquanto um doente pode apresentar até mais de 300 repetições neste *locus* (Hauge and Litt, 1993).

A ataxia espino-cerebelar do tipo 1 (SCA1) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma perda neuronal progressiva no cerebelo e tratos espino-cerebelares. As suas principais manifestações clínicas são a ataxia, disartria, oftalmoparese e graus variáveis de desgaste muscular (Banfi *et al.*, 1994). A doença se desenvolve geralmente após a terceira ou quarta década de vida e evolui progressivamente até levar à morte, devido ao comprometimento das funções bulbares, em um período que pode variar de dez a vinte anos após a manifestação dos primeiros sintomas (Banfi *et al.*, 1994).

No caso desta doença, o microsátélite foi encontrado dentro da região codificadora do gene da ataxina-1, que se apresenta de forma bastante complexa. Este gene, de função ainda desconhecida, foi caracterizado somente após a verificação dos microsátélites em seu interior. Composto por 9 exons, os sete primeiros não são traduzidos (onde se encontram as repetições), e os quatro primeiros exons sofrem *splicings* alternativos em diferentes tecidos. Nos indivíduos sãos, a quantidade de repetições de CAG varia de 6 a 39 repetições, enquanto os doentes apresentam de 41 a 81 repetições.

A coréia de Huntington é também uma doença neurodegenerativa progressiva, que geralmente se manifesta já na vida adulta do indivíduo (entre 30 e 40 anos). É caracterizada por movimentos involuntários (coréia), distúrbios cognitivos e psiquiátricos, alterações da afetividade e convívio

social, declínio da capacidade intelectual, chegando finalmente à demência e morte dentro de um período que varia de 15 a 20 anos após a manifestação dos primeiros sintomas (Goldberg *et al.*, 1993).

Novamente uma expansão em um microsatélite mostrou-se estar relacionada com a doença. O trinucleotídeo CAG aparece na porção codificadora de um gene, de função ainda desconhecida, arbitrariamente denominada de IT15. (The Huntington's Disease Collaborative Reserch Group, 1993)

É interessante ressaltar que nas últimas três doenças se observam formas juvenis de manifestação de doenças geralmente associadas à vida adulta. Além deste fato, foi visto que existe uma correlação muito forte entre o quadro clínico e a manifestação juvenil, pois quanto mais cedo um indivíduo apresenta os primeiros sintomas, mais grave é o quadro associado. Acrescentando mais um fato ao já confuso padrão temos o *imprinting* que parece atingir os casos juvenis. Sempre que existe um caso juvenil, a herança é especificamente paterna ou materna dependendo da doença. Por exemplo, na coreia de Huntington, quando ocorre a forma juvenil, o gene contendo expansão sempre é herdado do pai (Goldberg *et al.*, 1993; Telenius *et al.*, 1993). Já no caso da distrofia miotônica, o gene contendo expansões sempre provem da mãe do indivíduo (Hauge and Litt, 1993).

O que realmente acontece nestes casos é a existência de um aumento no número de repetições preferencialmente por um dos sexos, com o passar das gerações. Isto é, parece existir certas condições que capacitam o aumento no número de amplificações, de geração para geração. Como a idade de manifestação está associada ao número de repetições, com o passar das gerações a idade de manifestação será progressivamente menor, causando o fenômeno da antecipação. A antecipação, por sua vez, está associada ao tamanho das repetições: quanto maior for a seqüência de repetições em tandem, maiores serão as diferenças a serem formadas devido a mutação dinâmica. É por essa razão que parece existir um certo tipo de *imprinting* atuando sobre a permissividade de ocorrer este tipo de mecanismo.

Em alguns genes parece que a presença de microsatélites se faz realmente necessária. Nestes casos aparentemente existe um outro mecanismo para impedir o fenômeno de amplificação progressiva através de gerações. Como nós já sabemos, quanto maior for uma seqüência deste tipo, maiores serão as próximas amplificações, pois não haverá nenhuma restrição para a ocorrência de mutações dinâmicas, uma vez que um mote pode encontrar homologia em qualquer outro na região repetida da fita complementar. O

artifício encontrado pela natureza foi entremear diferentes motes regularmente distribuídos através das seqüências de motes repetitivos. Isso impede que grandes deslocamentos aconteçam entre as fitas complementares na região dos microsátélites, fixando as duas fitas àquelas posições previamente estabelecidas.

Tal fenômeno realmente ocorre e já foi descrito no gene da FMR1 (o envolvido na síndrome do X frágil) e no gene da ataxina-1 (ataxia espinocerebelar tipo 1). No primeiro caso observamos um trinucleotídeo AGG a cada 9~10 repetições de CGG, e que a perda de AGG quase sempre está associada à amplificação e à manifestação da doença (Eichler *et al.*, 1994) e no caso da ataxina-1, o trinucleotídeo envolvido é o CAT, que está entremeadado com repetições de CAG (Eichler *et al.*, 1994).

Instabilidade em Câncer

Até então os interesses estavam direcionados para estas doenças, com comprometimento neurológico e outras de causas desconhecidas. Ninguém ainda havia lembrado do câncer como uma enfermidade de origem gênica e disposto a olhá-la com outra visão. Foi então que, em 1993, surgiram dois trabalhos onde o enfoque principal era dado a possível associação de câncer com instabilidade de microsátélites.

O primeiro destes artigos foi publicado em junho de 1993 (Ionov *et al.*, 1993) e inicialmente os autores não haviam imaginado o que seria encontrado. A metodologia utilizada foi a técnica de *fingerprinting* usando AP-PCR, isto é, PCR realizado com primers arbitrariamente escolhidos, ou seja, sem sítios específicos. Com isso se pretendia localizar eventuais diferenças entre o tecido tumoral e o tecido normal, ou seja, perdas e ganhos de alelos específicos a cada um dos tecidos.

Ao verificar uma série de alelos tumor-específicos com tamanho reduzido em relação aos alelos correspondentes no tecido normal, os autores seqüenciaram estes alelos e verificaram, pela primeira vez, a ocorrência de instabilidade de microsátélites em cânceres, mais especificamente em câncer colorretal.

Devemos lembrar que em estudos de instabilidade de microsátélites em câncer os procedimentos passam a ser um pouco diferentes. Nestes casos, teoricamente, as diferenças estão apenas nos tumores. Como os microsátélites são altamente polimórficos de indivíduo para indivíduo, não há como adotar uma amostra por padrão.

O único e o melhor controle é algum tecido proveniente do próprio indivíduo que não o tumor, pois teoricamente este não apresentaria instabilidade e representaria os microsátélites no seu estado normal para o genoma inteiro. É importante ressaltar novamente que a diferença, a princípio, estaria somente em células cancerosas. Assim, qualquer diferença no tamanho do microsátélite decorrente da instabilidade será evidenciada quando compararmos os mesmos microsátélites em duas amostras da mesma pessoa.

O tecido normalmente utilizado é o sangue, devido à facilidades operacionais, pois dispensa a realização de biópsias desconfortáveis e desnecessárias. Outros tecidos podem ser utilizados sem problemas, bastando apenas a utilização de protocolos de extração eficientes para cada caso.

Logo em seguida, em dezembro do mesmo ano, o grupo liderado por Albert de la Chapelle mostrou o mesmo fenômeno em uma síndrome onde ocorre vários tipos de cânceres associados a um principal: a síndrome de carcinoma colorretal hereditário não-poliposo (HNPCC - *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Nesta enfermidade, além do câncer colorretal que lhe dá o nome, aparecem sempre associados cânceres de endométrio e de estômago, e menos freqüentemente, cânceres de laringe, de mama, de pulmão ou cerebrais (Peltomäki *et al.*, 1993).

Neste trabalho foi utilizado, pela primeira vez, o PCR usando primers específicos para amplificar *loci* de microsátélites, previamente descritos como uma fonte alternativa de novos marcadores moleculares (Weissenbach, 1992).

Com esta estratégia a escolha dos microsátélites a serem amplificados também pode ser feita de maneira arbitrária, uma vez que a ocorrência de instabilidade parece depender, *a priori*, apenas da capacidade de um mote poder se parear a outro que não o seu correspondente. Porém é possível também, com tantos marcadores disponíveis, escolher os melhores que se adaptem aos seus objetivos. Por exemplo, de la Chapelle e sua equipe escolheram os microsátélites tendo em mente duas propriedades: a capacidade de se amplificar todos os sete *loci* de uma mesma amostra em apenas duas reações e a localização cromossômica destes microsátélites, baseado na correlação existente entre a doença e o cromossomo ligado a mesma (Peltomäki *et al.*, 1993).

Neste mesmo trabalho, de la Chapelle examinou, além do câncer colorretal, os outros cânceres associados a HNPCC, com diferentes resultados que serão discutidos mais adiante.

Um pouco mais tarde, em fevereiro de 1994, Wooster e colaboradores (Wooster *et al.*, 1994) publicaram um artigo onde a principal preocupação era

mostrar que é possível verificar a existência de instabilidade de microsátélites em cânceres, inclusive em alguns tipos que o grupo do de la Chapelle não conseguiu detectar. Estes cânceres consistiam em mamários, cerebrais, ovarianos e sarcomas de tecidos moles. A metodologia adotada foi a mesma (amplificação usando primers específicos de microsátélites), porém foram incluídas algumas seqüências de microsátélites que se encontravam dentro de alguns genes.

Os resultados se mostraram extremamente variados, porém não houve um tipo sequer de câncer por eles estudados que deixou de apresentar instabilidade em pelo menos um microsátélite (Wooster *et al.*, 1994).

A partir de então, numerosos trabalhos começaram a surgir indicando instabilidade em uma grande variedade de cânceres. Entre os diversos tipos podemos citar o câncer endometrial, com 23% de incidência (Burks *et al.*, 1994); carcinoma das células renais, com 25% de incidência (Uchida *et al.*, 1994); câncer gástrico, com 33% de incidência (Lin *et al.*, 1995); câncer de células pequenas do pulmão, com 45% de incidência (Merlo *et al.*, 1994); câncer de células não-pequenas do pulmão, com 34% de incidência (Shridhar *et al.*, 1994); cânceres decorrentes da síndrome de Muir-Torre, com 46% de incidência (Honchel *et al.*, 1994); adenocarcinomas esofageais de Barrett, com 10% de incidência (Meltzer *et al.*, 1994); câncer ovariano, com 17% de incidência (King *et al.*, 1995) e câncer de cérebro, com 1,9 % de incidência (Wooster *et al.*, 1994). Logicamente esta lista não contém todos os trabalhos já feitos neste campo, porém é suficiente para evidenciar a importância dada ao assunto nos últimos três anos. Além disso, mostra uma grande variação na incidência de instabilidade de microsátélite nos diferentes tipos de canceres, por exemplo, indo de 45% no caso de câncer de células pequenas do pulmão, a zero por cento no caso de câncer da tireóide (Vermiglio *et al.*, 1995).

Além destes dados, existem outros interessantes, que merecem comentários à parte. Por exemplo, em um determinado artigo, foi realizado uma comparação entre os cânceres colorretais esporádicos e os hereditários. Neste estudo (Aaltonen *et al.*, 1994) foi verificado que existe uma diferença na porcentagem de incidência de instabilidade de microsátélite entre os dois tipos, mesmo que os tipos histológicos afetados sejam os mesmos. Assim, de acordo com os dados do artigo, em cânceres colorretais esporádicos, a incidência é de 16%, e em cânceres colorretais hereditários, este número sobe para 86%. Isso nos leva a imaginar uma predisposição herdada, que facilitaria a ocorrência destes mecanismos de instabilidade nos casos hereditários ou mesmo de que

esta predisposição favoreça o aparecimento do câncer e de instabilidade, mesmo que estes dois não tenham uma relação de causa e efeito mútuo.

O mesmo fato é observado em câncer endometrial. Este tipo de câncer ocorre principalmente em duas ocasiões: ou esporadicamente, ou associado ao câncer colorretal hereditário não-poliposo (HNPCC). O tipo esporádico, quando foi examinado quanto à instabilidade, mostrou 17% de incidência, enquanto o tipo associado mostrou um valor de 75%. Mais uma vez podemos perceber a gritante diferença existente entre os dois tipos de casos.

Um outro trabalho que merece destaque é o apresentado por Horii e colaboradores (Horii *et al.*, 1994). Este grupo comparou a existência de instabilidade entre dois grupos de pacientes: um composto por indivíduos que tiveram apenas um câncer primário e outro composto por indivíduos que tiveram múltiplos cânceres primários (exclui, assim, os casos recidivos). Os dados mostram que a instabilidade no primeiro grupo estava dentro dos valores médios dos cânceres esporádicos e simples (um único câncer primário), por volta de 11% de incidência. O segundo grupo apresentou 89% de incidência no mesmo estudo, o que vem reforçar a tese de que existe outros fatores mais complexos atuando do que o simples mecanismo de mutação dinâmica.

Instabilidade em Câncer de Mama

Em câncer de mama, os números referentes à incidência são conflitantes. O primeiro artigo que traz informações sobre instabilidade em câncer de mama é o mesmo onde foi descrito a ocorrência de instabilidade em HNPCC (Peltomäki *et al.*, 1993). Da mesma forma que os casos de câncer endometrial, já foi verificada anteriormente associação de alguns casos de câncer de mama com o HNPCC, porém em frequência menor. Por esta razão, de la Chapelle e colaboradores resolveram verificar se o mesmo fenômeno de instabilidade também atingia os cânceres de mama de um modo geral. Para tanto o estudo contou com 84 pares de amostras (tumor e sangue) que foram analisadas quanto a sete diferentes *loci* para verificar instabilidade. O resultado, ao contrário do que se esperava, não mostrou alteração alguma, apesar da grande amostragem.

Um outro estudo, na mesma linha, foi realizado por Wooster e colaboradores (Wooster *et al.*, 1994). A amostragem analisada foi ainda maior, contando com 104 pacientes e análise de doze microsátélites diferentes; desta vez os resultados confirmaram a ocorrência de instabilidade neste tipo de tumor com uma incidência de 10,6%.

Em 1994, dois artigos tratando também do mesmo assunto foram publicados. Yee e colaboradores (1994), analisando sete *loci* de microsatélite em 20 pacientes, nos fornece uma incidência de 20% de instabilidade, um significativo aumento se compararmos com os dois trabalhos anteriores.

Já Patel e colaboradores (1994), ao trabalhar com apenas 13 pacientes e nove *loci* de microsatélites, observaram instabilidade em 100% das amostras.

Em 1995 foi publicado mais um estudo desta mesma doença. Contegiacomo e colaboradores (1995) apresentaram dados referentes a 8 diferentes microsatélites de 28 pacientes italianas, das quais 6 apresentaram alguma alteração de microsatélite, correspondendo a 21% da amostragem.

Desta maneira é possível verificar que ainda existem controvérsias quanto a relevância de instabilidade de microsatélites em câncer de mama, uma vez que se observou incidências que variam de 0% a 100% (tabela 4).

Tabela 4: Estudos de instabilidade de microsatélites em câncer de mama

Grupo	Pacientes	Microsatélites	Incidência
<i>Peltomaki et al., 1993</i>	84	7 <i>loci</i>	0 %
<i>Wooster et al., 1994</i>	104	12 <i>loci</i>	10,6 %
<i>Yee et al., 1994</i>	20	7 <i>loci</i>	20 %
<i>Patel et al., 1994</i>	13	9 <i>loci</i>	100 %
<i>Contegiacomo et al., 1995</i>	28	8 <i>loci</i>	21 %

Sistemas de Reparo

Uma dúvida intrigou os pesquisadores no início dos estudos sobre microsatélites: se seqüências de microsatélites são tão freqüentes no genoma e se duplicação do DNA é um fenômeno que está constantemente ocorrendo, como explicar que as taxas observadas de incidência de instabilidade são tão modestas? Além disso, mutações dinâmicas podem ser observadas também *in vitro*, entretanto, em freqüências bem maiores do que as verificadas *in vivo*. As respostas a essas questões deveriam apresentar alguma correlação com a própria duplicação do DNA ou com um sistema de reparo que corrigiria os deslizes da mutação dinâmica.

Nessa ocasião já havia sido descrito o sistema de reparo do tipo *mismatch repair*, tanto em bactérias como em leveduras, o qual tem como

principal função a detecção da ocorrência de mutações dinâmicas durante a duplicação que antecede a meiose ou a mitose.

Dessa forma, Strand e colaboradores (Strand *et al.*, 1993), usando leveduras como modelo, começaram por verificar o nível de alterações que existiria se os genes do sistema *mismatch repair* fossem alterados.

Assim, os três genes envolvidos no sistema de leveduras são o PMS1, MLH1 e MSH2 (que por sua vez são homólogos aos genes bacterianos do sistema MutLHS - MutL, MutH e MutS - também responsáveis pela manutenção da fidelidade da replicação). No estudo em questão, os autores mostraram que linhagens independentes com um destes genes mutado em cada uma, aumentaram a taxa de instabilidade de 100 a 700 vezes. Além disso, também foi verificado que ao juntarem duas mutações em genes diferentes numa mesma linhagem, as taxas de instabilidade não aumentaram além dos valores já obtidos, confirmando o fato de todos os três genes estarem acoplados em um sistema único, onde a perda de função de um único gene é suficiente para comprometer o sistema inteiro (Strand *et al.*, 1993).

Para completarem o estudo, o grupo verificou que a taxa de instabilidade de linhagens onde as polimerases não apresentam a atividade de verificação de erros (*proof-reading*) era relativamente baixa.

Assim, todas estas informações sugerem que a taxa de mutações dinâmicas *in vivo* é relativamente alta, porém a maioria destes erros seriam corrigidos por sistemas de reparo celulares.

Quase na mesma época surgiu um estudo semelhante, porém em humanos. Fishel e colaboradores (Fishel *et al.*, 1993) também tiveram a mesma idéia do grupo de Strand e começaram por procurar em genomas humanos genes homólogos aos do sistema bacteriano ou de levedura, uma vez que já foi comprovado que estes sistemas de reparo estão relativamente bem conservados em eucariotos (Holmes *et al.*, 1990). A procura foi frutífera e o primeiro gene deste tipo de reparo a ser descrito para humanos foi o gene hMSH2, homólogo tanto ao MutS, de sistemas bacterianos, quanto ao MSH2, de sistemas de reparo de leveduras. Uma vez identificado, o grupo imediatamente procurou por mutações existentes neste gene em famílias apresentando o HNPCC. Logo verificaram que havia uma correlação entre mutações no gene hMSH2 e a ocorrência de instabilidade no HNPCC. No entanto esta correlação não estava muito bem estabelecida, pois o grupo de Fishel não tinha à sua disposição grandes genealogias para verificar o HNPCC em si (lembrando que é uma doença familiar).

Assim, uma semana mais tarde, Leach e colaboradores (Leach *et al.*, 1993) publicaram um artigo onde, através de análises de grandes genealogias e com uso de marcadores, conseguiram clonar um gene, por sinal o mesmo que o grupo de Fishel conseguiu clonar - o hMSH2. Como este último grupo tinha à sua disposição estas grandes genealogias (lembrando que Leach faz parte da equipe que primeiro demonstrou instabilidade de microsatélite em HNPCC), este estudo veio a comprovar a correlação entre hMSH2 e HNPCC.

E como era de se esperar, o mesmo grupo (que conta com grandes pesquisadores como Albert de la Chapelle, J. Craig Venter e Bert Vogelstein) ainda descreveu mais três genes, todos relacionados ao HNPCC e homólogos de genes de sistemas de reparo bacterianos e de levedura. Estes genes são o hMLH1, homólogo do gene MutL em bactérias e MLH1 em leveduras (Papadopoulos *et al.*, 1994), o hPMS1 e o hPMS2, também homólogos do gene bacteriano MutL (Nicolaidis *et al.*, 1994).

As proteínas destes sistemas apresentam, ainda, várias particularidades: a proteína hMSH2 tem capacidade para se ligar ao DNA (Prolla *et al.*, 1994) e, além de se ligar ao DNA, o hMSH2 o faz de maneira específica: somente quando encontra estruturas chamadas de *IDL-mismatches* (*Insertion-Deletion Loop-type mismatches*), com mais de 14 pares de bases, geralmente formadas quando temos a ocorrência de mutação dinâmica (Fishel *et al.*, 1994). As proteínas MLH1 e PMS1 apresentam capacidade de formarem heterodímeros, e este por sua vez, mostra afinidade pela proteína hMSH2 quando ligado ao DNA.

Todas estas peculiaridades levaram Prolla e colaboradores (Prolla *et al.*, 1994) a apresentarem um modelo de interação de todas as proteínas do sistema. Este modelo sugere que o hMSH2 se liga ao DNA quando localiza um *IDL-mismatch*, no local que ocorre o erro. Uma vez ligado, acredita-se que ocorre uma mudança na sua conformação de modo a estabilizar a ligação e talvez prover sítio de ligação para os heterodímeros MLH1-PMS1. Ao mesmo tempo, os heterodímeros formados pelo MLH1 e PMS1 estão de prontidão, esperando um sinal para formar um complexo com o hMSH2 modificado. Uma vez integrados, o complexo ternário pode então executar as funções de excisão, resíntese e ligação, necessários para a correção do erro DNA (Prolla *et al.*, 1994).

Ainda existe muitas questões a serem respondidas com relação aos sistemas de reparo. A principal delas consiste em esclarecer se estes defeitos nos sistemas de reparo não seriam uma peculiaridade do HNPCC ao invés de consenso em todos os casos de instabilidade. Mesmo porque existem tipos

diferentes de enfermidades decorrentes de instabilidade: aquelas que atingem todas as células do organismo (tais como a coréia de Huntington) e aquelas onde existe incidência em tecidos específicos (como os cânceres, em geral). Assim, até que sejam realizados outros estudos detalhados e cuidadosos, correlacionando os sistemas de reparo, não poderemos colocar um ponto final nesta questão.

Perda de heterozigosidade

Este fenômeno foi primeiramente descrito em análises de polimorfismos de DNA na região próxima ao *locus* RB1, em tumores de pacientes com retinoblastoma hereditário e esporádico.

Nestes pacientes foi verificado que, embora os indivíduos dos quais foram colhidos tumores fossem heterozigóticos em muitos *loci*, os tumores eram homozigóticos nos mesmos *loci*. Ao se analisar mais detalhadamente este fato, constatou-se que as amostras do DNA tumoral continham alelos de apenas um dos dois homólogos do cromossomo 13, revelando uma perda de heterozigosidade para o segmento 13q na região do gene.

A perda de heterozigosidade em si pode ter vários mecanismos de origem, no entanto é possível destacar alguns tais como a deleção estrutural e a recombinação mitótica. (Fig. 11).

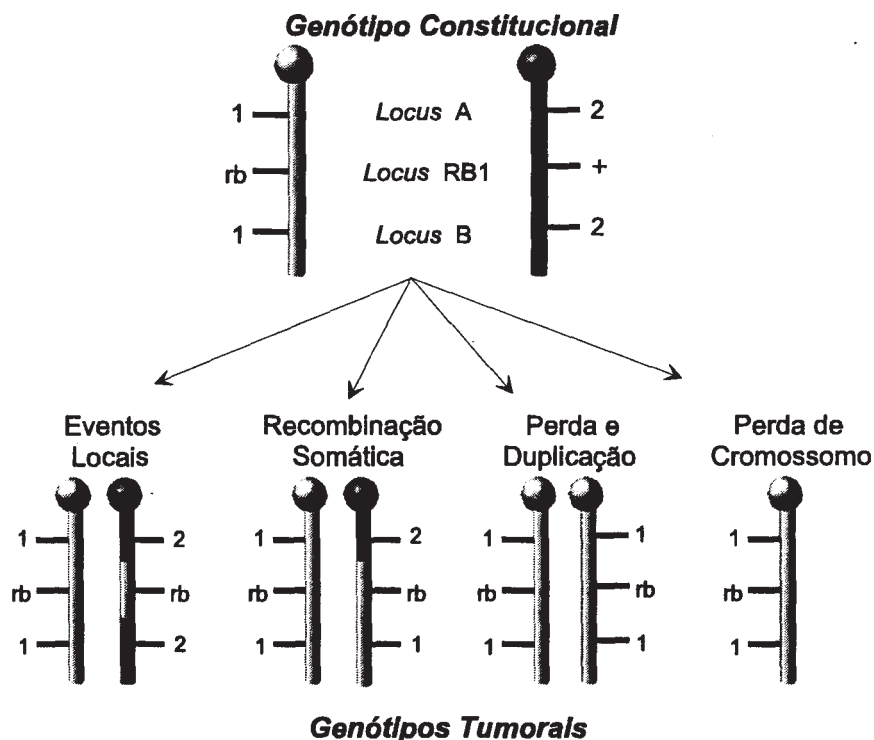


Figura 11: Mecanismos cromossômicos que podem levar à perda de heterozigosidade para marcadores do DNA em, ou próximo a, um gene de supressão tumoral num indivíduo heterozigótico para uma mutação da linhagem germinativa, ilustrados no caso do gene de retinoblastoma no cromossomo 13q (adaptado de Thompson & Thompson, 1993).

Devido a estes mecanismo, perdas de heterozigosidade em alguns *loci* específicos estão frêquentemente associadas a ocorrências de cânceres originados pela deleção ou inativação de genes supressores tumorais. Inclusive este é uma das evidências utilizadas para definir se um deterinado gene poderia ser algum supressor tumoral.

OBJETIVOS

1. Verificar a frequência de instabilidade de microsatélite em câncer de mama, de uma amostra da população de Campinas e região.
2. Comparar as frequências obtidas neste estudo com as frequências apresentadas na literatura, incluindo outros tipos de cânceres e outros *loci* estudados, para tentar delinear um possível padrão existente nos diversos casos de instabilidade.
3. Avaliar os antecedentes anamnésicos para tentar se estabelecer correlações possíveis com as instabilidades de microsatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foram estudados 34 pacientes (33 mulheres e 1 homem) afetados por carcinomas malignos de mama, todos acompanhados no Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. É importante ressaltar que as pacientes escolhidas para o estudo nunca se submeteram a nenhum tipo de terapia coadjuvante que pudesse influenciar no genoma de maneira não-biológica, tais como as quimioterapias compostas que utilizam agentes alquilantes de DNA (ciclofosfamidás, por exemplo) ou radioterapias. Desta maneira eliminamos um importante fator que poderia comprometer os resultados obtidos.

Dados anamnésicos

Os dados anamnésicos dos pacientes foram obtidos através de consultas aos prontuários dos mesmos. Os dados relevantes levantados foram a idade, o estadiamento (sistema TNM), o tipo do carcinoma, o grau histológico, a quantidade de linfonodos apresentando metástases, a idade de menarca, a idade de telarca, o estado menopausal, a idade no primeiro parto, os antecedentes ginecológicos, os antecedentes oncológicos pessoais e os antecedentes oncológicos familiares.

Os dados não disponíveis são decorrentes de desinformação pessoal dos próprios pacientes ou de extravios de determinados prontuários.

Coleta de material

A coleta do sangue e dos tecidos tumorais dos pacientes foi realizada no Centro Cirúrgico do CAISM - UNICAMP.

a. Sangue

O sangue periférico foi sempre coletado antes das cirurgias, durante o pré-cirúrgico. Entre 10 e 20 ml de sangue foram coletados, de cada paciente, em tubo de centrifuga de polipropileno contendo EDTA 10% como anticoagulante. Logo após a coleta, o mesmo foi mantido sob refrigeração e transportado até as dependências do laboratório de Genética Humana - CBMEG, onde é centrifugado a 1500g, por 15 minutos a 4°C para retirar o plasma. O *pellet* de células foi estocado a -20° C.

b. Tumor

Após a remoção completa da mama, retirou-se o tumor segundo a localização que encontra-se na ficha ambulatorial. Procedeu-se, então a separação de um pequeno fragmento, o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. O pequeno fragmento deve ser cuidadosamente definido, uma vez que é preferível trabalhar com material do tumor sem contaminação por parte de tecidos adjacentes normais (Fig. 12). O resto do material se destina a análises clínicas e anátomo-patológicas realizadas por equipes especializadas do CAISM.

Logo após o congelamento, o tumor foi transportado até as dependências do laboratório de Genética Humana - CBMEG - para então ser estocado a -70°C.

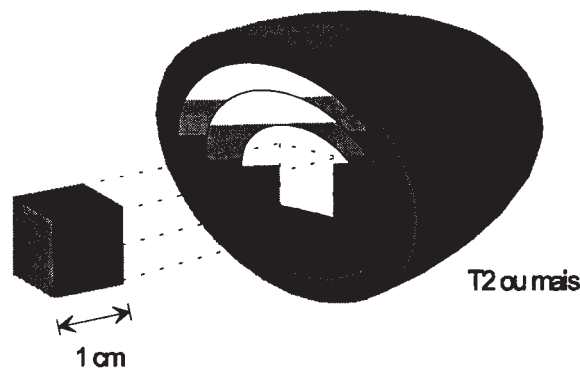


Figura 12: Remoção da amostra de tumor utilizado no estudo.

Extração do DNA genômico

a. Sangue

O protocolo a seguir descrito foi adaptado de Owerbach (comunicação pessoal). Inicia-se a partir de 15 ml de sangue total (com plasma). Ao sangue adiciona-se 35 ml da solução A (1% Triton-X; 5mM MgCl₂; 0,32M Sacarose; 10mM Tris pH 8,0), mistura-se por inversão e coloca-se em gelo por 30 minutos. Segue-se uma centrifugação a 1500g por 10 minutos a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* em 20ml da solução A. Procede-se uma nova centrifugação a 1500g por 15 minutos a 4°C. Deve-se fazer a lavagem do *pellet* descrito anteriormente várias vezes, até que se torne limpo (esbranquiçado, menos avermelhado possível). Ao atingir esta etapa, ressuspende-se o *pellet* em 1ml de solução B (10mM Na₂EDTA; 20mM NaCl; 20mM Tris pH 8,0) e, em seguida, adiciona-se 250µl da solução C preparada na hora (1ml = 0,5 ml solução B contendo 1mg de proteinase K + 0,5ml SDS 10%) e incuba-se a 37 °C *overnight*. Em seguida a solução é tratada duas vezes com uma mistura de fenol saturado com Tris-HCl 10mM pH 8,0, clorofórmio e álcool isoamílico (numa proporção de 25:24:1). Agita-se por 10 minutos e centrifuga-se a 1500g por 15 minutos. Retira-se a fase superior que, após a segunda extração será tratada com uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Então o DNA é precipitado adicionando-se 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e incubando-se a -20°C por aproximadamente 18 horas. Coleta-se a nuvem de DNA que se forma devido à precipitação com o auxílio de uma alça de plástico estéril, específica para este fim. Faz-se uma lavagem do material com gotas de etanol a 70% para eliminar excesso de sais. A seguir o *pellet* é ressuspendido em 500µl de tampão TE (10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA). A concentração final do DNA em µg/µl é determinada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro. Os DNAs são então estocados a 4°C.

b. Tumor

Parte 1: Processamento pré-extração - fragmentação com bisturi

Toma-se o material e deixa-se descongelar. Em seguida, deposita-se o mesmo sobre uma placa de Petri, previamente resfriada e apoiada em um recipiente com gelo. Sobre a placa e, com a ajuda de um ou dois bisturis, corta-se o tecido em vários fragmentos até que se torne impossível conseguir pedaços menores. Tal método requer maior velocidade possível na sua execução para

evitar degradação demasiada do DNA das amostras. A quantidade de material pode variar entre 0,2 g e 1 g de tecido.

Parte 2: Extração propriamente dita

Toma-se o material previamente processado e acrescenta-se o tampão de digestão (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % SDS; 0,1 mg/ml proteinase K), incubando-se, em seguida, a 50°C por 12 a 18 horas, ao fim dos quais deverá estar homogêneo. A extração com fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico, a precipitação, e a concentração final do DNA são realizados à mesma maneira descrita na extração do sangue.

Marcação radioativa dos primers

Uma vez que os produtos de amplificação seriam submetidos à separação por meio de gel de poliacrilamida, foi necessário utilizar uma técnica para evidenciá-los após a eletroforese. Foi adotado então o protocolo de marcação radioativa, por permitir detecção de fortes sinais, mesmo que a quantidade do produto de amplificação seja mínima. Este protocolo utiliza a enzima T4 polinucleotídeo quinase e radionuclídeos [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP para marcação terminal do *primer*. A quantidade final de cada reagente por marcação dependeu da quantidade de amostras amplificadas para análise. Dessa maneira, por amostra amplificada foi preparada 1 μl de reação, sendo esta última composta por 0,05 μl de um dos *primers* do par (concentração de 20 μM), 0,1 μl do tampão 10X que acompanha a enzima, 0,1 μl de radionuclídeo [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (atividade de 500 μCi), 0,05 μl de enzima T4 polinucleotídeo quinase (5U/ μl) e água Milli-Q q.s.p. 1 μl . Seguindo esta proporção, pôde-se multiplicar pelo número de amostras a serem amplificadas e efetuar uma única reação de marcação. Após juntar todos os reagentes, a reação é levada a 37°C por 1 hora e, então, a enzima é desativada termicamente por 15 minutos a 94°C, pois inativá-la com métodos que utilize quelantes de íons poderia comprometer a reação de amplificação em si.

PCR com Primers Locus-específico

Amplificou-se de 75 a 155 ηg de DNA genômico em 25 μl de volume final de reação contendo 10 mM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl , 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1 μM da cada

primer (por análise utilizamos um par), 1µl da reação de marcação (descrita anteriormente) e 2 U de Taq DNA polimerase. Devido às diferenças existentes nos *primers*, cada par de primer tem as suas condições de amplificação. Tais condições são descritas separadamente. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador, modelo “Thermal-Cycler”, fabricado pela Perkin-Elmer Corporation.

Microsatélite D17S807 (Yee et al, 1994)

Mote de repatição amplificado: (CA)_n

Sequencia dos primers utilizados:

D17a: 5' GCT TAG AAG GAA AAT CAT AAC CT

D17b: 5' AGA TAT GTA CAC TCA CTC CTA C

Condições de amplificação:

Após a mistura dos componentes, a solução é submetida a 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. É finalizado por 5 minutos a 72°C e preservação a 4°C até a retirada do material.

Microsatélite AR Xq11-12 (Yee et al., 1994)

Mote de repetição amplificado: (CAG)_n

Sequencia dos primers:

AR1: 5' GTG CGC GAA GTG ATC CAG AA

AR2: 5' TCT GGG AGC CAA CCT CTC TC

Condições de amplificação:

Após a mistura dos componentes, a solução é submetida a 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C. Ao fim dos 5 ciclos, inicia-se 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C e 1 minuto a 72°C. É finalizado por 5 minutos a 72°C e preservação a 4°C até a retirada do material.

Microsatélite D10S89 (Weber & May, 1989)

Mote de repetição amplificado: (CA)_n

Sequencia dos primers:

D10a: 5' AAC ACT AGT GAC ATT ATT TTC A

D10b: 5' AGC TAG GCC TGA AGG CTT CT

Condições de amplificação:

Após a mistura dos componentes, a solução é submetida a 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C. É finalizado por 5 minutos a 72°C e preservação a 4°C até a retirada do material.

Microsatélite EST493 (Haddad et al., comunicação pessoal)

Mote de repetição amplificado: (CAA)_n

Sequencia dos primers:

Não disponíveis no momento. Os primers nos foram gentilmente cedidos por Luciana Haddad, aluna de doutorado na UFMG, sob orientação do Dr. Sérgio Pena. Como se trata de sequencias ainda não publicadas, não nos foi informado da sequencia deste par de primers.

Condições de amplificação:

Após a mistura dos componentes, a solução é submetida a 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos a 72°C. É finalizado por 5 minutos a 72°C e preservação a 4°C até a retirada do material.

Análise das amostras

Após a amplificação, as amostras precisaram ser preparadas de modo adequado antes de serem carregadas no gel para a eletroforese. Para tanto, fez-se uma mistura de 3µl do produto de amplificação de cada amostra com 2µl do tampão de carregamento (Loading Buffer II, Merck, Art.204). A seguir o material foi levado para desnaturação por 5 minutos a 94°C e depois colocado em gelo. Deve-se carregar o gel logo em seguida.

A análise apurada dos produtos de PCR dependem de uma boa separação dos mesmos, uma vez que podem ocorrer diferenças mínimas entre um produto e outro, na mesma amostra e também em amostras diferentes. O gel utilizado foi o de 6% de poliacrilamida desnaturante contendo uréia 8M. As eletroforeses foram realizadas a 2000 Volts e aproximadamente 25 Watts de potência. O tempo de duração de cada corrida foi de aproximadamente 5 horas. Em seguida o gel, aderido a uma das placas de corrida devido ao uso de Bind-Silane, foi levado para ser fixado em uma solução contendo 10% de ácido acético e 10% de metanol por 30 minutos e rehidratação do mesmo por 20 minutos em água corrente. Por fim o gel, fixada à placa, foi colocado em uma estufa a 42°C para secar durante uma noite.

Autorradiografias

Após a secagem, o gel se torna extremamente fino e quebradiço. Porém, como está firmemente aderido à placa, o manuseio é muito mais facilitado. Ao gel expomos um filme de raio-X, por um período de tempo que depende da intensidade da radiação proveniente do primeiro. O nível de radiação está diretamente relacionado à eficiência da marcação das sondas ou do sucesso na amplificação dos microsátélites, e é medido simplesmente com um contador *Geiger* sobre o gel. Após o período de exposição, o filme é revelado com processo padrão.

Métodos estatísticos

Para efeitos de comparação, os nossos resultados foram analisados juntos a resultados de estudos semelhantes (detecção de instabilidade de microsátélites). Porém, existe uma considerável variação tanto nas frequências encontradas, quanto na quantidade de amostras e suas naturezas. Em outras palavras, temos variações nas frequências devido a diferentes tipos de tumores e suas amostragens limitadas.

Para eliminarmos as influências de efeitos de amostragem nas frequências e verificarmos qual a variação aceitável, calculamos os intervalos de confiança de cada um dos resultados considerados nas análises. Desta maneira pudemos verificar o comportamento dos *loci* de maneira mais fiel e confiável. Assim, as análises de intervalo de confiança de cada amostragem foram realizadas da seguinte maneira:

1. Calculamos a frequência de ocorrência ($\hat{p}$) de instabilidade de cada resultado (incluindo-se os estudos anteriormente realizados):

$$\hat{p} = \frac{m}{n}$$

onde:

n = número de casos da amostragem

m = número de casos de instabilidade encontrados

2. A seguir, calculamos o intervalo de confiança (P) para a frequência encontrada, considerando o tamanho da amostra. Do cálculo do P , obtivemos dois valores, um valor máximo e um valor mínimo, ambos relativos à frequência ($\hat{p}$), e que delimitam o intervalo.

$$P = \frac{m + \frac{t^2}{2} \pm t \sqrt{\hat{\sigma}^2 + \left(\frac{t^2}{4}\right)}}{n + t^2}$$

$t_{\infty} = 1,96$ limite de confiança: 95%

onde:

n = número de casos da amostragem

m = número de casos de instabilidade encontrados

t_{∞} = valor de t para infinitos graus de liberdade

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{m + (n - m)}{n}$$

RESULTADOS

Foram analisadas, como citado anteriormente, 34 pacientes, sendo 33 mulheres e 1 homem, afetados por carcinomas malignos da mama. As características clinico-patológicas dos 34 tumores, incluindo tipo histológico, estágio, estado dos linfonodos axilares e idade dos pacientes estão dispostas na tabela 5. Como é possível verificar, a amostragem é bastante heterogênea, abrangendo pacientes com históricos diferentes.

Tabela 5: Dados oncológicos das pacientes do estudo. *nd*: não disponível

Paciente	Idade	Estadament o Sistema TNM	Carcinoma	Grau histológico	Metástases em linfonodos
V002	75	T4bN2M0	Ductal Invasivo	3	25
V005	46	T2N0M0	Ductal Invasivo	3	1
V007	81	T2N1M0	Adenose esclerosante com metaplasia apócrina	0	0
V010	58	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V013	38	T2N0M0	Ductal Invasivo	3	3
V014	68	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V015	76	T3N2M0	Ductal Invasivo	3	5
V020	56	T3N1M0	Intraductal múltiplos focos	0	1
V021	76	T2N0M0	Coloidal	0	0
V022	76	T4bN2M0	Ductal Invasivo	0	0
V023	64	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0
♂ V024	49	nd	nd	0	0
V025	56	T4aN1M0	Ductal Invasivo	3	0
V026	35		Tumor filoides histol. maligno	0	0
V027	54	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V028	82	T2N2M0	Infiltrativo	0	0
V029	44	T2N1M1	Ductal Invasivo	2	0
V030	58	T2N0M0	Ductal Invasivo	3	0
V031	38	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	2
V032	48	T2N2M0	nd	0	0
V033	70	T4dN2M0	Ductal Invasivo	3	3
V034	69	T4N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V035	67	T2N1M0	Ductal Invasivo	2	0
V036	45	T3N1M0	Ductal Invasivo	2	1
V037	66	T4bN0M0	Ductal Invasivo	3	0
V038	52	T4cN0M0	nd	0	0
V039	59	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V040	53	T2N0M0	Ductal Invasivo	3	0
V041	46	T2N0M0	nd	0	0
V042	70	T2N2M0	Ductal Invasivo	3	2
V043	73	T2N0M0	Papilífero Invasivo	1	0
V044	84	T4bN1M0	Ductal Invasivo	3	2
V045	77	T3N1M0	Ductal Invasivo	3	0
V046	60	T2N1M0	Ductal Invasivo	3	0

Tabela 6: Dados ginecológicos das pacientes do estudo. *nd:* não disponível

Paciente	Menarca	Telarca	Menopausa	Primeiro parto	Antecedentes ginecológicos
V002	14	14	50	30	G10P5A5
V005	10	9	menstrua	14	G5P5A0
V007	13	nd	50	30	G9P7A2
V010	12	nd	46	36	G2P2A0
V013	11	11	menstrua	22	G2P0A0
V014	13	12	46	20	G14P10A4
V015	13	nd	51	0	G0P0A0
V020	12	11	50	34	G4P3A1
V021	15	nd	50	25	G1P1A0
V022	13	12	40	29	G5P3A2
V023	17	17	49	nd	G4P4A0
♂ V024	nd	nd	nd	nd	nd
V025	11	12	46	0	Paciente virgem
V026	16	nd	menstrua	21	G3P2NM12
V027	11	nd	47	nd	G3P3A0
V028	15	15	53	28	G1P1A0
V029	14	12	menstrua	18	G5P4A1
V030	12	nd	52	20	G6P5A1
V031	14	nd	ainda menstrua	22	G2P2A0
V032	nd	nd	nd	nd	nd
V033	14	11	48	0	G0P0A0
V034	14	14	37	nd	G2P2A0
V035	15	nd	45	25	G2P2A0
V036	13	13	35	27	G2P2A0
V037	13	14	44	24	G3P3A0
V038	11	12	menstrua	25	G3P3A0
V039	14	nd	46	16	G9P9A0
V040	12	nd	45	28	G1P1A0
V041	17	11	menstrua	0	G0P0A0
V042	11	11	49	20	G6P2A4
V043	14	11	51	0	G0P0A0
V044	15	15	50	24	G11P9A2
V045	18	15	50	22	G14P14A0
V046	13	12	47	22	G3P3A0

Tabela 7: Antecedentes oncológicos das pacientes do estudo. *nd:* não disponível

Paciente	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais
V002	Pai: câncer de fígado	Sem antecedentes
V005	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V007	Irmã: câncer de cabeça*	Sem antecedentes
V010	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V013	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V014	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V015	Duas irmãs: câncer de mama	Sem antecedentes
V020	Tia: câncer de intestino Primo: câncer de laringe	Sem antecedentes
V021	Tia materna: câncer de útero	Sem antecedentes
V022	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V023	Tia paterna: câncer de colo do útero	Sem antecedentes
♂ V024	nd	nd
V025	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V026	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V027	Avó materna: leucemia Irmã: câncer de ovário	Sem antecedentes
V028	Mãe: câncer de pele Irmã: câncer de mama Irmão: leucemia	Sem antecedentes
V029	Avô: Câncer de boca	Sem antecedentes
V030	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V031	Tia materna: Câncer de mama	Sem antecedentes
V032	Mãe: Câncer de intestino	Sem antecedentes
V033	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V034	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V035	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V036	Sem antecedentes	Ca. colo útero (em 1985)
V037	Tia: câncer de estômago	Sem antecedentes
V038	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V039	Irmã: câncer de estômago	Sem antecedentes
V040	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V041	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V042	Mãe: câncer de mama (aos 73 anos)	Sem antecedentes
V043	Mãe: câncer de esôfago Irmão: câncer de intestino	Sem antecedentes
V044	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V045	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V046	Irmã: câncer de mama	Sem antecedentes

*- relato da própria paciente

Com o objetivo de detectar a ocorrência de instabilidade de microsátélites em cada um dos pacientes, analisamos, pela técnica de PCR, quatro *loci* de microsátélites distribuídos ao longo do genoma humano. Todas as análises são de caráter comparativo entre o DNA extraído do tumor e o DNA extraído do sangue do mesmo paciente. A detecção de instabilidade de microsátélite em si consiste, então, em verificar a existência de diferenças de

tamanho dos produtos de PCR provenientes de amplificações dos DNAs de diferentes origens de um mesmo paciente.

Tabela 8: Resultados das análises realizadas. *nd*: não disponível

Paciente	D17S807	AR Xp11-12	D10S19	ESR 493
V002	nd	nd	negativo	negativo
V005	negativo	perda de heterozigose	negativo	negativo
V007	negativo	negativo	positivo	negativo
V010	negativo	negativo	negativo	negativo
V013	negativo	negativo	negativo	negativo
V014	negativo	negativo	negativo	negativo
V015	negativo	negativo	nd	negativo
V020	negativo	negativo	negativo	negativo
V021	negativo	negativo	negativo	negativo
V022	negativo	positivo	negativo	negativo
V023	negativo	negativo	negativo	negativo
V024	negativo	negativo	negativo	negativo
V025	negativo	positivo	negativo	negativo
V026	negativo	negativo	negativo	negativo
V027	negativo	negativo	negativo	negativo
V028	negativo	negativo	nd	negativo
V029	negativo	negativo	nd	negativo
V030	negativo	negativo	nd	negativo
V031	negativo	negativo	negativo	negativo
V032	negativo	negativo	negativo	negativo
V033	negativo	negativo	negativo	negativo
V034	negativo	negativo	negativo	negativo
V035	nd	nd	nd	negativo
V036	nd	negativo	nd	negativo
V037	negativo	nd	negativo	negativo
V038	negativo	negativo	negativo	negativo
V039	negativo	negativo	negativo	negativo
V040	negativo	nd	negativo	positivo
V041	negativo	negativo	negativo	negativo
V042	negativo	negativo	negativo	nd
V043	negativo	negativo	negativo	nd
V044	nd	negativo	nd	nd
V045	nd	nd	negativo	nd
V046	nd	nd	nd	nd

Locus AR

Este microsatélite está localizado na região codificante do gene do receptor de andrógeno. Desta maneira tivemos condições de verificar as instabilidades de microsatélites que ocorrem neste tipo de região e compará-las

com outros microsátélites em regiões codificantes e não codificantes. Além destas características acima, o microsátélite em questão está localizado no cromossomo X, um outro cromossomo que parece estar envolvido em na carcinogênese dos tumores de mama.

Dentre todos os quatro *loci* analisados, este foi o que apresentou mais instabilidades nas amostras. De um total de 28 pacientes, dois destes apresentaram instabilidade neste *locus*: pacientes V022 e V025. Além destes foi também observado uma perda de heterozigosidade, na paciente V005. As figuras abaixo exemplificam a normalidade (Fig. 13) e as amostras que apresentaram instabilidade (Fig. 14):

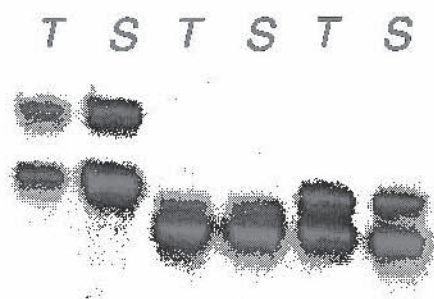


Figura 13: Amostras sem instabilidades (*locus* AR Xq11-12). T: tumor, S: sangue.

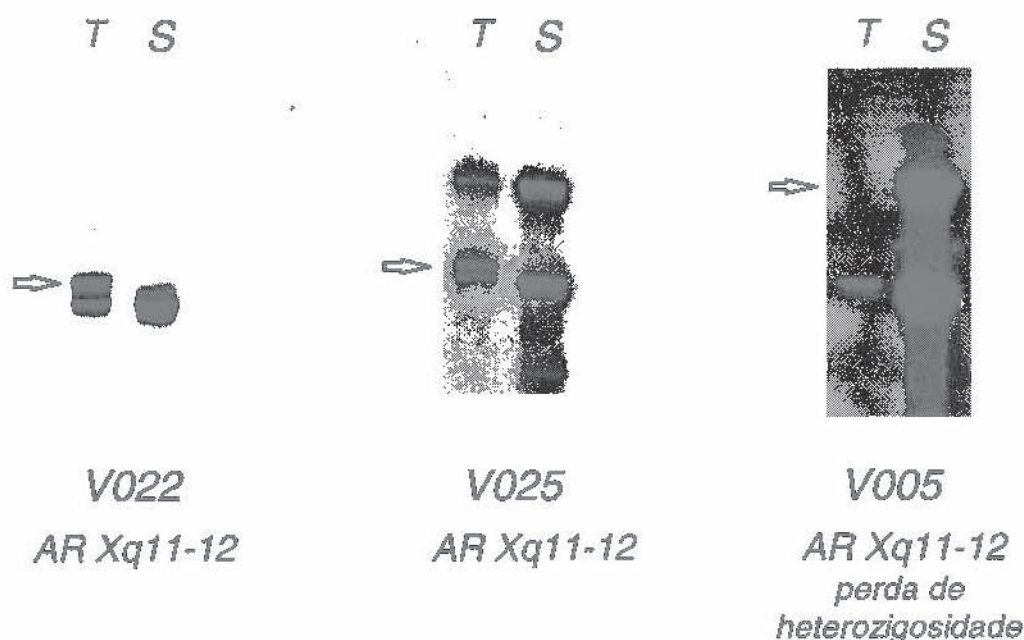


Figura 14: Alterações em amostras. V022 e V025: instabilidade de microsátélites; V005: perda de heterozigosidade; T: tumor, S: sangue.

Locus D17S807

Este *locus* foi escolhido por estar situado no cromossomo 17, que parece estar ligado à ocorrência de cânceres de mama de uma maneira geral (tanto de casos esporádicos tanto de casos hereditários) e também por ser neste cromossomo que se encontra o gene supressor de tumores p53, de grande relevância nos estudos atuais. No entanto, o microsatélite específico estudado foi definido de maneira arbitrária. Além disso, este microsatélite está situado em uma região não-codificante do genoma humano. Desta maneira será possível compararmos este tipo de microsatélite com o tipo que se encontra em uma região codificante. Este *locus*, após ser analisado, não mostrou nenhuma instabilidade em 32 pacientes analisados.

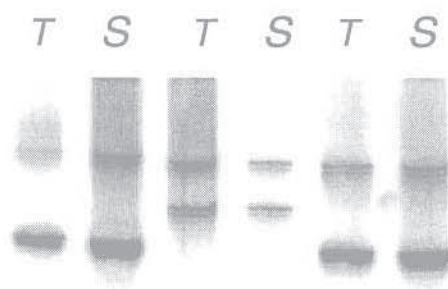


Figura 15: Amostras sem instabilidade (*locus* D10S807) . T: tumor, S: sangue.

Locus D10S89

Este *locus* também foi escolhido de maneira arbitrária. As primeiras alíquotas deste primer, assim como a referência da primeira descrição dos mesmos, nos foram gentilmente cedidos por Roberta do Amaral Andrade Uchôa e Dr. Arnaldo Medeiros, da filial São Paulo do Instituto Ludwig. Da mesma maneira que o microsatélite D17S807, este *locus* também está situado em uma região não-codificante. Esta característica será um parâmetro interessante para ser comparado mais adiante.

Após padronização e a ordem de síntese dos primers para a amplificação do microsatélite D10S89, os resultados foram produzidos e se mostrou pobre em instabilidades de tumores de mama. Assim, dos 24 pacientes (tivemos problemas de amplificação com as amostras restantes), foi observado

instabilidade em apenas um destes, como é possível verificar na figura abaixo (Fig. 16b).



Figura 16: *a.* amostras sem instabilidade (*locus* D10S89). *T:* tumor, *S:* sangue.
b. paciente V007 com instabilidade. *T:* tumor, *S:* sangue.

Locus EST 493

Este *locus* faz parte de uma proteína expressa, de função ainda desconhecida. Da mesma maneira que os primers para amplificar o microsatélite D10S89, os primers necessários para a amplificação deste *locus* nos foram gentilmente cedidos por Luciana Amaral Haddad, integrante do grupo de pesquisa do prof. Sérgio Danilo Pena, da UFMG. Como citado anteriormente (ver Materiais e Métodos) este *locus* faz parte da tese de doutoramento que está sendo desenvolvido pela Luciana Haddad e como se trata de uma sequência inédita, não nos foi informado as sequências dos primers utilizados.

Este microsatélite se encontra localizado no cromossomo 2, constitui em uma *Expressed Sequence Tag* (EST), e portanto faz parte de uma sequência codificante. Até o momento, o mapeamento físico ainda não está disponível (Haddad, comunicação pessoal).

Assim, dos 29 pacientes analisados, 1 demonstrou instabilidade neste *locus* (Fig. 17).

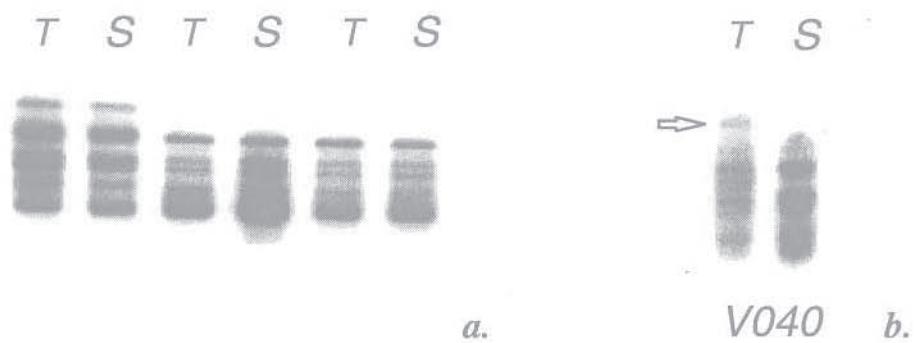


Figura 17: *a.* amostras sem instabilidade (*locus* EST 493). *T*: tumor, *S*: sangue.
b. paciente V040 com instabilidade. *T*: tumor, *S*: sangue.

DISCUSSÃO

Foram analisados pacientes apresentando neoplasias malignas de mama, com o principal objetivo de se averiguar a ocorrência de instabilidade de microsátélites no genoma do tecido tumoral e também estabelecer a frequência que este tipo de mutação afeta a população em geral.

Para estas análises foram empregadas quatro *loci* de microsátélites, que foram, em uma primeira instância, arbitrariamente escolhidos. Apesar da arbitrariedade, é possível distinguir características particulares de cada *locus*, possibilitando a verificação de alguns parâmetros interessantes e que podem estar correlacionados com o fenômeno da instabilidade em si.

As análises foram realizadas conforme descrito no item 'Métodos estatísticos', da seção 'Materiais e métodos'. Os dados obtidos desta maneira foram analisados tanto isoladamente, quanto conjuntamente e estão descritos nos próximos itens da discussão.

Microsatélite D17S807

O primeiro *locus* analisado foi o D17S807. Este *locus* foi inicialmente descrito por Weissenbach e colaboradores (Weissenbach, 1992) e apresentado, junto a outros microsátélites, como alternativa para novos marcadores moleculares, devido às suas características polimórficas. Localizado no cromossomo 17, o mesmo onde se encontra o gene supressor de tumores p53, este microsátélite não se encontra em região codificadora.

De uma maneira geral, o cromossomo 17 tem sido relativamente bem estudado quanto à presença de instabilidade em seus microsátélites. Até o presente momento já foram analisados pelo menos dez diferentes *loci*, em regiões codificadoras e não-codificadoras, publicados em artigos relativos a instabilidade de microsátélites em cânceres de maneira geral (D17S261, câncer de células renais (Uchida *et al.*, 1994); D17S787, HNPCC (Aaltonen *et al.*, 1994; Peltomäki *et al.*, 1993); D17S786, câncer de células pequenas do pulmão (Merlo *et al.*, 1994); D17S785, câncer gástrico (Lin *et al.*, 1995); D17S579 e D17S588, HNPCC (Bergthorsson *et al.*, 1995); D17S250, câncer de mama (Contegiacomo *et al.*, 1995); D17S807, câncer de mama (Yee *et al.*, 1994)). Estes *loci* se encontram distribuídos ao longo do cromossomo 17 e incluem um microsátélite localizado dentro da região codificadora do gene supressor de tumor p53 (Tenan *et al.*, 1994; Honchel *et al.*, 1994) e outro localizado,

também na região codificadora, do gene supressor de metástases nm23-H1 (Patel *et al.*, 1994) (tabela 9).

Tabela 9: Resultados de análises realizados com diversos microsátélites do cromossomo 17. *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Gene	Referência	n	m	$\hat{p}$ (%)	P1 (%)	P2 (%)
1	nm23-H1 (17q21.3)	Patel <i>et al.</i> , 1994	13	6	46,15	70,85	23,20
2	D17S157	Peltomäki <i>et al.</i> , 1993	84	0	0	4,37	2,53E-16
3	D17S261	Uchida <i>et al.</i> , 1994	36	3	8,33	21,22	2,87
4	D17S786	Marlo <i>et al.</i> , 1994	33	2	6,06	19,00	1,67
5	D17S250	Contegiacomo <i>et al.</i> , 1995	28	1	3,57	17,71	0,03
6	D17S854	Bergthorsson <i>et al.</i> , 1995	46	7	15,21	28,22	1,67
7	D17S855	Bergthorsson <i>et al.</i> , 1995	46	1	2,17	11,33	0,03
8	D17S796	Woodward <i>et al.</i> , 1994	104	0	0	3,56	2,01E-16
9	D17S807	Yang <i>et al.</i> , 1994	26	3	11,53	28,97	4,00
10	D17S157	Este estudo	32	0	0	10,71	6,2E-16

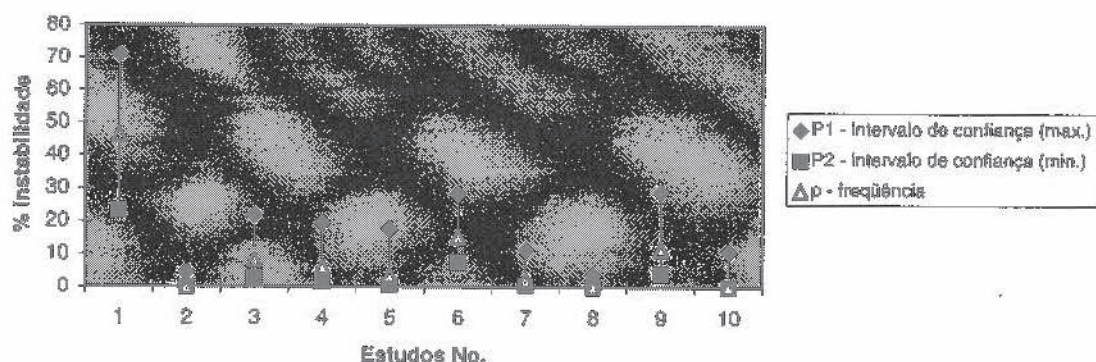


Gráfico 1: Frequências e intervalos de confiança obtidos nos estudos da tabela 9.

Os resultados dos trabalhos anteriores permite separarmos os mesmos em dois grupos: um onde o câncer de mama é relevante e é analisado e outro, onde as pesquisas não incluem o câncer de mama. Tanto em um quanto em outro grupo, podemos observar a presença de instabilidade, porém, parece haver uma maior discrepância nos resultados do último (Gráfico 2).

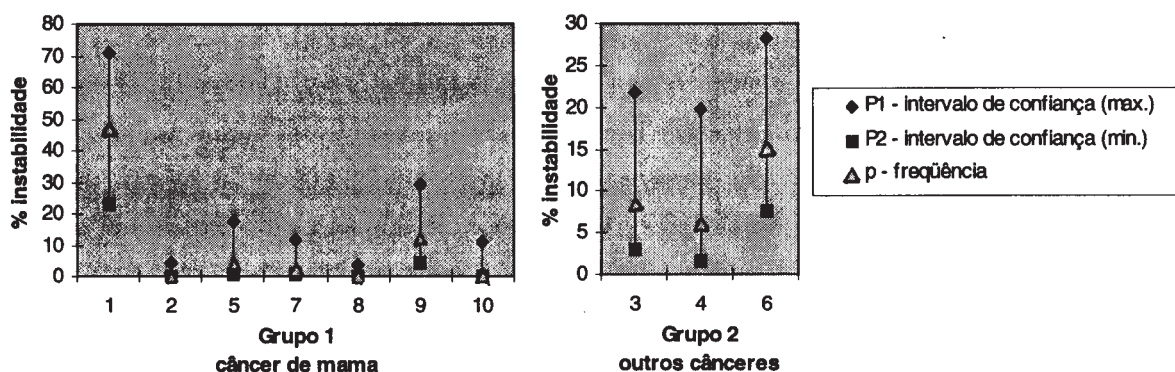


Gráfico 2: Frequências e intervalos de confiança dos estudos da tabela 9 agrupados pelos tipos de cânceres analisados.

Nos trabalhos onde o câncer de mama é analisado, temos resultados que variam de 0% de instabilidade no *locus* D17S787 (84 pacientes analisados, série 2 do Gráfico 2) (Peltomäki *et al.*, 1993), até 46,1% (13 pacientes analisados, série 1 do Gráfico 2), no *locus* nm23-H1 (17q21.3). Quando levamos em consideração que, a princípio, a instabilidade (quando ocorre) é um fenômeno generalizado devido a mutações em genes de reparo, esta discrepância pode ser significativa.

Observando-se os casos do primeiro grupo, pudemos verificar que a discrepância foi devida somente a um *locus* em especial, nm23-H1, utilizado por Patel e colaboradores (Patel *et al.*, 1994). Os outros *locus* do cromossomo 17 utilizados para o estudo de microsatélite em câncer de mama mostraram taxas de instabilidade praticamente iguais a zero. Isto sugere que, de uma maneira geral, o fenômeno de instabilidade não ocorre no cromossomo 17 de pacientes de câncer de mama. Além disso, os resultados ainda sugerem que o mecanismo de instabilidade em questão não deve ser o responsável pela clássica correlação existente entre este cromossomo e o câncer de mama.

Podemos interpretar o resultado obtido por Patel e colaboradores (Patel *et al.*, 1994) como casual (ou até mesmo resultante de algum artefato de técnica), pois as frequências encontradas são realmente discrepantes, quando comparadas a frequências de outros estudos com câncer de mama. O fato se repete para outros *loci* do mesmo estudo e serão discutidos mais adiante.

Já os resultados do segundo grupo (o que não inclui o câncer de mama), referentes a outros *loci* estudados em diversos tipos de câncer, parecem indicar que nestes casos a instabilidade está presente, porém apresentando-se de maneira variada.

Microsatélite AR

O segundo *locus* analisado foi um microsatélite existente na região codificante do gene de receptor de andrógeno, localizado no cromossomo X. Este microsatélite já foi empregado anteriormente por Yee e colaboradores (Yee *et al.*, 1994) para se estudar o mesmo tipo de câncer do presente trabalho, o que possibilitou uma análise comparativa também deste *locus*.

Em um primeiro estudo, sobre microsatélites em câncer de células não-pequenas de pulmão, Shridhar e colaboradores (Shridhar *et al.*, 1994) demonstraram que a frequência de instabilidade neste *locus* era de 2 ocorrências em 38 pacientes, além de não ter sido visualizado nenhuma perda de heterozigosidade.

Yee e colaboradores (Yee *et al.*, 1994), analisando este mesmo aspecto do câncer de mama, chegaram a uma frequência semelhante. Encontraram duas pacientes com instabilidade e três apresentando perdas de heterozigosidade, dentre um total de 26 indivíduos analisados.

Em 1994, Wooster e colaboradores (Wooster *et al.*, 1994) também demonstraram a existência de instabilidade no microsatélite do receptor de andrógenos em 5 de 104 pacientes analisados, colocando os seus dados próximos aos obtidos pelos outros pesquisadores.

E finalmente, Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 1994) realizaram um estudo singular para averiguar mutações que ocorrem em repetições de trinucleotídeos. Para este estudo, o microsatélite adotado foi o presente no gene do receptor de andrógenos, por nós utilizado. Doadores normais foram analisados e as instabilidades encontradas foram computadas em relação ao número de cromossomos X (estimadas) presentes nas amostras de sêmen de cada doador. O resultado geral da análise revela 25% (49 instabilidades em 1939 amostras) (número estimado de cromossomos X).

Os nossos resultados indicam uma incidência de 6% (2 casos em 30 pacientes).

Tabela 10: Resultados de análises realizados com o microsatélite AR, localizado no cromossomo X (Xq11-12). *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Locus	Referência	<i>n</i>	<i>m</i>	$\hat{p}$ (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
1	AR Xq11-12	Shridhar et al., 1994	38	2	5,26	17,26	1,45
2	AR Xq11-12	Li et al., 1994	1939	49	2,53	3,32	1,91
3	AR Xq11-12	Woodward et al., 1994	104	4	3,84	8,47	1,50
4	AR Xq11-12	Este estudo	30	2	6,66	21,32	1,94
5	AR Xq11-12	Yee et al., 1994	30	2	7,69	24,14	1,13

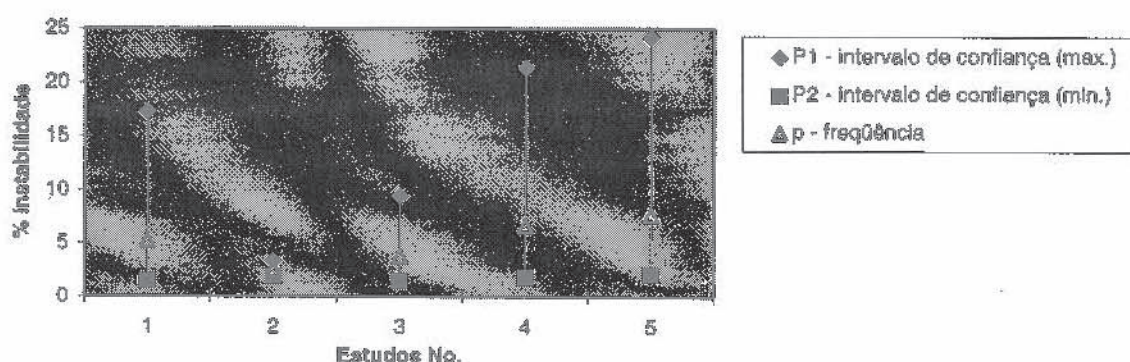


Gráfico 3: Frequências e intervalos de confiança obtidos nos estudos da tabela 10.

Após os cálculos dos intervalos de confiança dos resultados acima citados, pudemos verificar a indicação de existência de uma frequência de instabilidade comum a este *locus*, apesar da amostragem em diferentes doenças e diferentes populações. As pequenas diferenças na incidência parecem ser devidos a erros de amostragem e cada resultado está dentro dos intervalos de confiança dos outros resultados, exceção feita ao trabalho de Patel e colaboradores (1994).

Desta maneira, os resultados sugerem que além de ser comum (pois foi verificado instabilidade em todos os *loci* estudados), as instabilidades que ocorrem neste *locus* não devem estar relacionadas ao desenvolvimento de câncer de mama em si, uma vez que outros estudos também constataram frequências similares no mesmo *locus*.

Faz-se necessário ressaltar que entre os resultados temos dados de literatura de instabilidade de origem somática e germinativa. Isto parece apontar para algum processo frequente neste *locus*, com ocorrência independente do tipo celular. Isso sugere que o processo envolvido neste *locus* não está

diretamente relacionado aos diversos tipos de câncer, e sim se tratar de um fenômeno constitucional e evidenciado devido ao interesse deste tipo de estudo.

Microsatélite D10S89

Até o momento, em estudos semelhantes, todas as análises do cromossomo 10 foram realizadas utilizando-se somente o *locus* D10S197 (exceto uma, que utilizou D10S193) e em nenhum artigo este fato foi justificado por autor algum. Dessa maneira, para verificar se é possível existir alguma correlação entre os dados de microsatélites do mesmo cromossomo, novamente tomamos os valores de diversos trabalhos e os confrontamos com os nossos resultados, após ter definido os intervalos de confiança. É importante ressaltar que os outros estudos incluem vários tipos de câncer, tais como o HNPCC (e os cânceres associados a esta enfermidade) (Peltomäki *et al.*, 1993), câncer gástrico (Rhyu *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995), adenocarcinomas esofageais (Meltzer *et al.*, 1994) e carcinomas endometriais (Burks *et al.*, 1994; Risinger *et al.*, 1994), além do próprio câncer de mama (Patel *et al.*, 1994; Peltomäki *et al.*, 1993).

Tabela 11: Resultados de análises realizados com dois microsatélites do cromossomo 10. *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Locus	Referência	<i>n</i>	<i>m</i>	$\hat{p}$ (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
1	D10S197	Patel <i>et al.</i> , 1994	8	7	87,5	97,75	52,91
2	D10S197	Burks <i>et al.</i> , 1994	30	6	20	37,30	9,5
3	D10S197	Meltzer <i>et al.</i> , 1994	106	7	6,60	13,00	3,23
4	D10S197	Rhyu <i>et al.</i> , 1994	52	9	17,30	29,73	9,38
5	D10S197	Peltomäki <i>et al.</i> , 1993	84	0	0	4,37	2,53E-16
6	D10S89	Este estudo	24	1	4,16	20,24	0,73
7	D10S89	Uchôa <i>et al.</i> , 1996 - comunicação pessoal	42	2	4,76	15,79	1,31

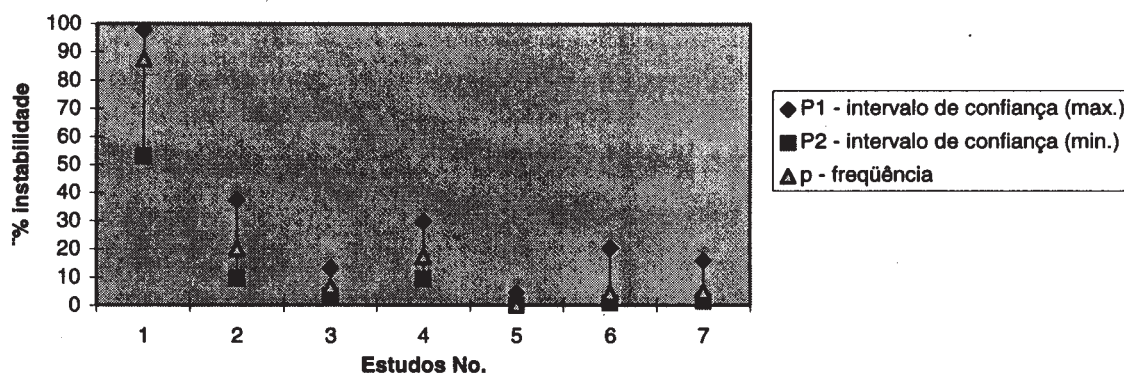


Gráfico 4: Frequências e intervalos de confiança obtidos nos estudos da tabela 11.

Depois das análises dos resultados disponíveis dos dois *loci*, pudemos verificar que as frequências de instabilidade relativas ao *locus* D10S197 apresentam uma variação significativa, que parece estar associado ao tipo de câncer. No entanto, o mesmo não pode ser dito a respeito do *locus* D10S89, por nós estudado.

Observando dois estudos envolvendo o *locus* D10S89, verificamos frequências de instabilidade praticamente idênticas, mesmo em diferentes tipos de câncer (presente trabalho; Uchôa *et al.*, comunicação pessoal). Dessa maneira, apesar de não serem comuns, a instabilidade no *locus* D10S89 parece ocorrer em células tumorais de diferentes naturezas e em frequências similares.

Assim, de acordo com os resultados disponíveis, nos parece que dependendo do tipo de câncer, existem *loci* que apresentam maior instabilidade que outros, em um mesmo cromossomo. Isso pode refletir a susceptibilidade de determinados *loci*, sob determinadas condições (leia-se: diferentes tipos de câncer), aos mecanismos da instabilidade.

Microsatélite EST 493

Os primers foram obtidos a partir de um EST (*expressed sequence tag*) isolado por Haddad e colaboradores e se encontra no cromossomo 2. Por se tratar de um microsatélite ainda inédito na literatura, não existem outros estudos com o mesmo publicados até o momento. No entanto existem vários outros estudos realizados em microsatélites do cromossomo 2. Na tabela abaixo temos os resultados que dispúnhamos, junto aos cálculos de intervalos de confiança para cada estudo realizado.

Tabela 12: Resultados de análises realizados com diversos microsátélites do cromossomo 2. *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Locus	Referências	<i>n</i>	<i>m</i>	$\hat{p}$ (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
1	D2S71	Contegiacomo <i>et al.</i> , 1995	28	1	3,57	17,71	0,63
2	D2S119	Patel <i>et al.</i> , 1994	9	5	55,55	81,12	26,66
3	D2S119	Meltzer <i>et al.</i> , 1994	106	2	1,88	6,62	0,51
4	D2S119	Rhyu <i>et al.</i> , 1994	52	11	21,15	34,03	12,24
5	D2S119	Burks <i>et al.</i> , 1994	30	4	13,33	29,68	5,30
6	D2S119	Vermiglio <i>et al.</i> , 1995	9	0	0	29,91	1,73E-15
7	D2S123	Patel <i>et al.</i> , 1994	9	2	22,22	54,74	6,32
8	D2S123	Meltzer <i>et al.</i> , 1994	106	2	1,88	6,62	0,51
9	D2S123	Rhyu <i>et al.</i> , 1994	52	15	28,84	42,27	18,32
10	D2S123	Burks <i>et al.</i> , 1994	30	6	20	37,30	9,50
11	D2S123	Vermiglio <i>et al.</i> , 1995	9	0	0	29,91	1,73E-15
12	D2S123	Wooster <i>et al.</i> , 1994	104	1	0,96	5,24	0,16
13	D2S123	Horii <i>et al.</i> , 1994	79	21	6,58	37,24	18,09
14	D2S147	Patel <i>et al.</i> , 1994	9	0	0	29,91	1,73E-15
15	D2S147	Meltzer <i>et al.</i> , 1994	106	2	1,88	6,62	0,51
16	D2S147	Rhyu <i>et al.</i> , 1994	52	9	17,30	29,73	9,38
17	D2S147	Burks <i>et al.</i> , 1994	30	4	13,33	29,68	5,30
18	D2S147	Vermiglio <i>et al.</i> , 1995	9	0	0	29,91	1,73E-15
19	D2S136	Merlo <i>et al.</i> , 1994	33	0	0	10,42	6,03E-16
20	D2S136	Horii <i>et al.</i> , 1994	79	21	26,58	37,24	18,09
21	D2S162	Merlo <i>et al.</i> , 1994	33	3	9,09	23,57	3,14
22	EST 493	Este estudo	29	1	2,85	17,17	0,61

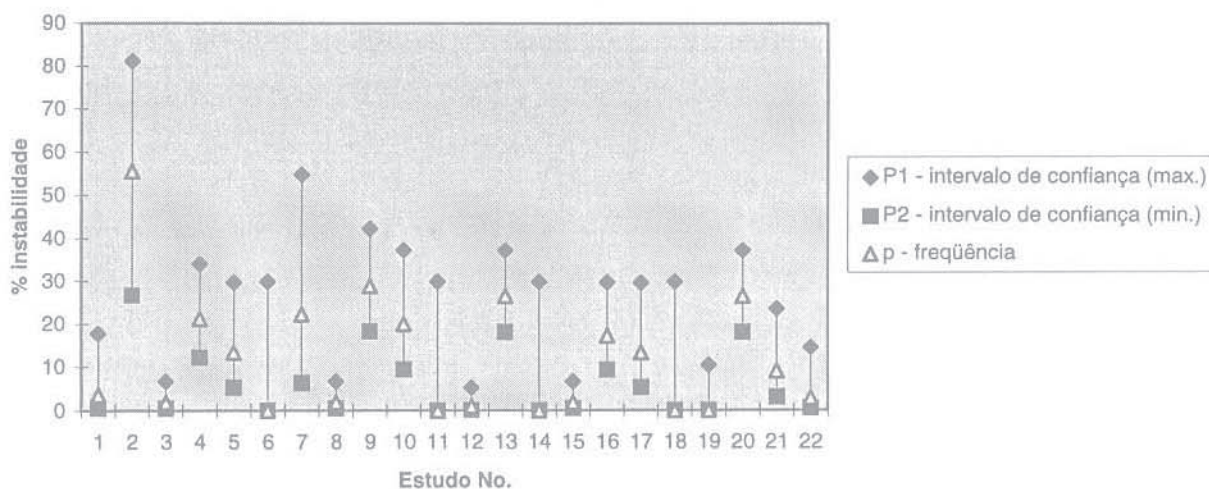


Gráfico 5: Frequências e intervalos de confiança obtidos nos estudos da tabela 12.

Da mesma maneira que os microsátélites do cromossomo 10, os microsátélites do cromossomo 2 mostram variações nas frequências de

instabilidade dependendo de características de cada *locus* e de cada tipo de câncer. Como é possível notar, os estudos que analisaram *loci* do cromossomo 2 em câncer de mama estão em concordância, onde as frequências se mostram próximas, variando entre 0% e 3,5% (séries 1, 12, 14 e 22 do gráfico 5). A frequência de cada estudo com câncer de mama sempre se encontrou dentro dos intervalos de confiança dos resultados dos demais estudos com a mesma doença, sugerindo que a instabilidade se apresenta de forma regular e consistente em diversos microsátélites deste cromossomo.

É digno de nota a exclusão dos resultados obtidos por Patel e colaboradores (séries 2 e 7 do Gráfico 5). Os resultados apresentados por este grupo novamente estão contrariando vários outros dados provenientes de outros grupos, que estudaram amostragens maiores que as apresentadas pelo autor. Dessa maneira acreditamos que a inclusão destes dados nas nossas análises poderiam descaracterizar o real comportamento dos *loci*, prejudicando o estudo. Então, realizamos as análises sem considerar os resultados de Patel, porém, não deixamos de apresentá-los pois achamos importante o informe completo dos dados coletados para este estudo.

Por fim, as análises realizadas nos vários *loci* dos cromossomos considerados neste estudo sugerem que, dependendo do câncer, existem *loci* apresentando mais instabilidade que outros *loci*. Por exemplo, enquanto no câncer endometrial o *locus* D10S197 apresentou 20 % de instabilidade (Burks *et al.*, 1994), no câncer de esôfago o mesmo *locus* apresentou 6,6 % de instabilidade (Meltzer *et al.*, 1994). Isto pode refletir particulares reações de um mesmo *locus* perante a diferentes condições (diferentes tipos tumorais) do meio.

A Instabilidade em Câncer de Mama

Com o objetivo de tentar estabelecer um panorama das instabilidade de microsátélite específico para este estudo, analisamos os nossos resultados comparando-os entre si.

Tabela 13: Resultados de análises realizados com os microsátélites deste estudo. *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Locus	<i>n</i>	<i>m</i>	$\hat{p}$ (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
1	D17S807	32	0	0	0,10	6,2E-18
2	AR Xq11-12	30	2	0,06	0,21	0,01
3	D10S89	24	1	0,04	0,20	0,01
4	EST 493	35	1	0,02	0,14	0,00

Como é possível verificar, as frequências estão relativamente próximas entre si, além de se encontrarem dentro de todos os intervalos de confiança. Dessa maneira, os resultados parecem indicar que a instabilidade em câncer de mama se faz presente de maneira generalizada, sem grandes discrepâncias entre as frequências de diferentes *loci*.

No entanto isto não significa que o mecanismo seja o mesmo para todos os *loci*. Como já foi comentado anteriormente, o *locus* AR parece apresentar um mecanismo que gera instabilidade de forma uniforme em diferentes tipos celulares (sejam estes somáticos ou germinativos, tumorais ou normais), diferentemente do que parece ocorrer com os outros *loci*, onde as frequências variavam de acordo com o tipo tumoral (observar os *loci* D2S119, D2S123, D2S147, D17S197 nas outras tabelas e gráficos).

Devido a insuficiência de estudos utilizando os mesmos *loci*, não podemos estabelecer se o mecanismo dos outros *loci* utilizados neste estudo (D10S89, EST 493 e D17S807) é diferente daquele que origina as instabilidades no *locus* AR.

Outro ponto que merece atenção é a frequência geral resultante da soma das frequências isoladas das instabilidades de cada *locus*. Muitos dos estudos analisam apenas por este ponto (muitos artigos chegam a publicar apenas a frequência de instabilidade em um determinado câncer, sem ao menos discriminar em tabela os *loci* onde foram observados instabilidade). Sob este mesmo ponto, a nossa frequência de instabilidade é de 12,5%. Comparado a outras frequências, os nossos números podem, a primeira vista, parecerem modestos (vide tabela 15).

Tabela 14: Quantidade de *loci* analisados por estudo e taxa de instabilidade por *locus*.
n: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; *Taxa de instabilidade* é obtido dividindo-se o *n* pelo número de *loci* analisado de cada estudo.

Referência	Câncer	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>Loci</i> <i>analisados</i>	<i>Taxa de instabilidade</i> <i>por locus</i>
Patel et al., 1994	mama	14	14	9	1,555556
Contegiacomo et al., 1995	mama	28	6	8	0,75
Yee et al., 1994	mama	26	4	7	0,571429
Este estudo	mama	32	4	4	1
Peltomaki et al., 1993	mama	84	0	8	0
Peltomaki et al., 1993	HNPOC	252	27	8	3,375
Aaltonen et al., 1994	HNPOC	29	25	7	3,571429
Aaltonen et al., 1994	Colorretal esporádico	49	8	7	1,142857
Bergthorsson et al., 1995	Colorretal	46	6	18	0,333333
Peltomaki et al., 1993	estômago	33	6	8	0,75
Lin et al., 1995	estômago	42	14	7	2
Rhyu et al., 1994	estômago	52	16	5	3,2
Peltomaki et al., 1993	endométrio	18	4	8	0,5
Risinger et al., 1993	endométrio	36	6	71	0,084507
Burks et al., 1994	endométrio	30	7	7	1
Peltomaki et al., 1993	pulmão	87	2	8	0,25
Merlo et al., 1994	células pequenas do pulmão	33	15	34	0,441176
Shridhar et al., 1994	células não- pequenas do pulmão	38	13	9	1,444444
King et al., 1995	ovário	41	7	2	3,5
Wooster et al., 1994	ovário	20	2	12	0,166667
Peltomaki et al., 1993	testículo	86	0	8	0
Meltzer et al., 1994	Adenocarcinom a esofageal	106	11	5	2,2
Vermiglio et al., 1995	tireóide	9	0	3	0
Uchida et al., 1994	células renais	36	9	7	1,285714
Wooster et al., 1994	sarcoma de tecidos moles	18	2	12	0,166667
Wooster et al., 1994	cérebro	54	1	12	0,083333
Honchel et al., 1994	Síndrome de Muir-Torre	25	13	4	3,25
Ogasawa et al., 1995	células escamosas do esôfago	35	21	7	3
Horii et al., 1994	Múltiplos cânceres primários	38	34	5	6,8
Horii et al., 1994	Único câncer primário	174	19	5	3,8

No entanto nós analisamos quatro *loci*, enquanto os outros estudos se valeram de maior quantidade de *loci*. Se considerarmos este parâmetro nas comparações puramente quantitativas, podemos verificar que a taxa de instabilidade por *locus* detectada em nosso estudo chega a ser maior que em outros estudos.

A causa desta diferença pode estar relacionada às peculiaridades dos diferentes *loci* analisados neste estudo. Uma outra causa poderia ser devido a composição étnica brasileira que, por ter uma grande taxa de miscigenação, pode ter frequências diferentes de instabilidade pois já foi verificado diferenças raciais em microsátélites (Ricke *et al.*, 1995).

É necessário ainda definir o que caracterizaria uma alta incidência de instabilidade. Um estudo com frequência alta de instabilidade, devido ao uso de muitos *loci* teria maior incidência de instabilidade que um outro estudo com uma frequência mais modesta, porém com uma taxa de instabilidade por *locus* maior ?

Existe um outro ponto a ser considerado: a instabilidade é um fato já confirmado em HNPCC, através de diversos estudos com cânceres associados a esta enfermidade (tais como câncer de colo, câncer de reto e câncer de endométrio (Peltomäki *et al.*, 1993)) e parece ser originado por defeitos em genes de reparo hMLH1, hPMS1 e hPMS2, responsáveis pela manutenção de sequencias de microsátélites.

Ao analisarmos os dados fornecidos por Peltomäki (1993) resultante de análises com pacientes com HNPCC, podemos perceber que existe um fato peculiar: os oito microsátélites analisados não mostraram instabilidade alguma quando verificados em tumores de mama. Isto pode sugerir que o mecanismo que originou a instabilidade nos estudos de casos esporádicos de câncer de mama não é o mesmo que originou a instabilidade nestes pacientes de HNPCC.

Existe ainda mais um parâmetro a ser comentado. O fato das seqüências estarem ou não em regiões codificantes. Dois dos microsátélites usados estavam em região codificante e outros dois não. Os resultados mostram que a instabilidade ocorre tanto em uma categoria quanto na outra, apesar de diferentes taxas de instabilidade. Isso sugere que não importa a localização do locus (se dentro ou fora de região codificadora) - a instabilidade parece ocorrer sem distinção deste parâmetro.

Análise Comparativa com Outros Tipos Tumoriais

Apesar das diversas incertezas que cercam o mecanismo das mutações dinâmicas, a instabilidade em si é um fato concreto, atingindo vários tipos celulares, podendo ser de origem somática ou germinativa. Dessa maneira, na tentativa de se verificar a existência de algum padrão entre as diferentes enfermidades envolvendo microsátélites, analisamos alguns dados destas diversas doenças.

Tabela 15: Resultados de análise dos dados provenientes de diversos estudos de instabilidade de microsátélites, em diferentes tipos de câncer. *n*: número de casos da amostragem; *m*: número de instabilidades encontradas na amostragem; $\hat{p}$: frequência de instabilidade; *P1*: limite máximo do intervalo de confiança; *P2*: limite mínimo do intervalo de confiança.

No.	Referência	Câncer	<i>n</i>	<i>m</i>	$\hat{p}$ (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
1	Patel <i>et al.</i> , 1994	mama	14	14	100	1	78,46
2	Contegiacorno <i>et al.</i> , 1995	mama	28	6	21,42	39,53	10,21
3	Yee <i>et al.</i> , 1994	mama	26	4	15,38	33,53	6,14
4	Este estudo	mama	32	4	12,5	28,06	4,97
5	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	mama	84	0	0	4,37	2,53E-16
6	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	HNPCC	252	27	10,71	15,13	7,46
7	Aaltonen <i>et al.</i> , 1994	HNPCC Colorretal	29	25	86,20	94,50	69,44
8	Aaltonen <i>et al.</i> , 1994	Colorretal esporádico	49	8	16,32	29,03	8,51
9	Bergthorsson <i>et al.</i> , 1995	Colorretal	46	6	13,04	25,66	6,11
10	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	estômago	33	6	18,18	34,38	8,61
11	Lin <i>et al.</i> , 1995	estômago	42	14	33,33	48,44	21,01
12	Rhyu <i>et al.</i> , 1994	estômago	52	16	30,76	44,26	19,91
13	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	endométrio	18	4	22,22	45,21	9,00
14	Risinger <i>et al.</i> , 1993	endométrio	36	6	16,66	31,89	7,87
15	Burks <i>et al.</i> , 1994	endométrio	30	7	23,33	40,92	11,79
16	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	pulmão	87	2	2,29	7,99	0,63
17	Merlo <i>et al.</i> , 1994	células pequenas do pulmão	33	15	45,45	62,01	29,84
18	Shridhar <i>et al.</i> , 1994	células não-pequenas do pulmão	38	13	34,21	50,10	21,21
19	King <i>et al.</i> , 1995	ovário	41	7	17,07	31,26	8,52
20	Wooster <i>et al.</i> , 1994	ovário	20	2	10	30,10	2,78
21	Peltomaki <i>et al.</i> , 1993	testículo	86	0	0	4,27	2,47E-16
22	Meltzer <i>et al.</i> , 1994	Adenocarcinoma esofageal	106	11	10,37	17,63	5,89
23	Vermiglio <i>et al.</i> , 1995	tireóide	9	0	0	29,91	1,73E-15
24	Uchida <i>et al.</i> , 1994	células renais	36	9	25	41,07	13,75
25	Wooster <i>et al.</i> , 1994	sarcoma de tecidos moles	18	2	11,11	32,80	3,10
26	Wooster <i>et al.</i> , 1994	cérebro	54	1	1,85	9,77	0,32
27	Honchel <i>et al.</i> , 1994	Síndrome de Muir-Torre	25	13	52	0,69	33,49
28	Ogasawa <i>et al.</i> , 1995	células escamosas do esôfago	35	21	60	74,44	43,57

29	Hori <i>et al.</i> , 1994	Múltiplos cânceres primários	38	34	89,47	95,82	75,86
30	Hori <i>et al.</i> , 1994	Único câncer primário	174	19	10,91	16,42	7,10

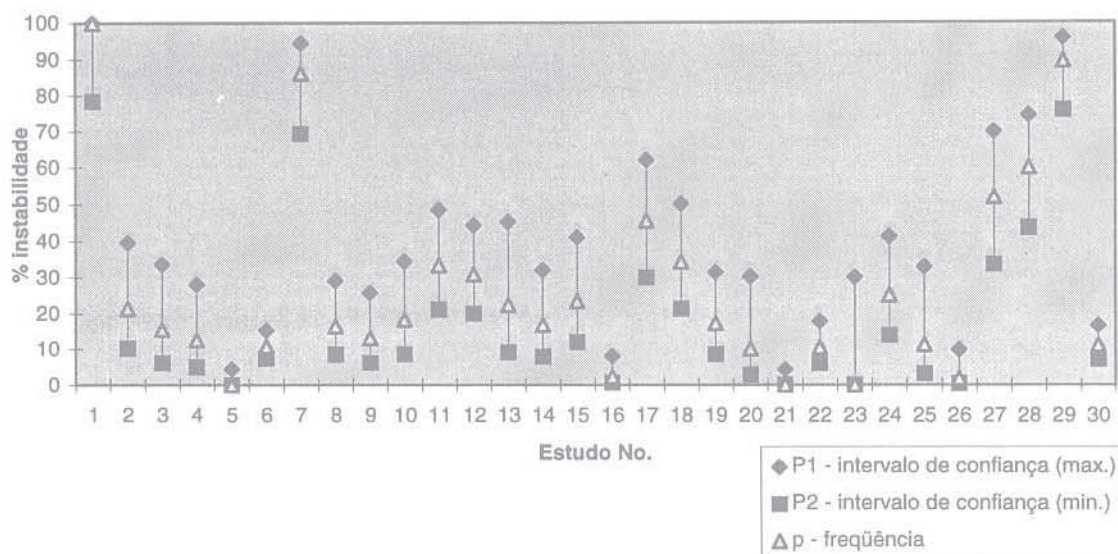


Gráfico 6: Frequências e intervalos de confiança referentes aos estudos da tabela 15.

Podemos observar que não existe um padrão comum entre os diversos cânceres, onde frequências de instabilidade para um mesmo tipo de câncer chegam a variar em até 100% (vide tabela 15). Devido a estas observações, poderíamos acreditar que para cada tipo de câncer diferentes microsátélites poderiam estar sendo afetados, resultando nas diferenças acima referidas pois, em muitos estudos, os microsátélites estudados eram diferentes.

Outro fator a ser considerado quando analisamos estes dados, consiste nas diferenças raciais. Dependendo da etnia do indivíduo, determinados microsátélites podem apresentar características próprias de cada população (Ricke *et al.*, 1995). Dessa maneira, parte das diferenças observadas pode ser atribuída aos diferentes grupos étnicos de cada estudo.

Correlações Clínicas

Analisamos também a possibilidade de haver alguma correlação entre as instabilidades e alguma característica clínica ou ginecológica. Os dados de todas as pacientes estão disponíveis na seção “Materiais e métodos”. Abaixo

temos os dados referentes às pacientes que apresentaram instabilidade de microsatélite.

Tabela 16: Dados oncológicos de pacientes que apresentaram instabilidade

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>Estadiamento Sistema TNM</i>	<i>Carcinoma</i>	<i>Grau histológico</i>	<i>Metástases em linfonodos</i>
V007	81	T2N1M0	Adenose esclerosante com metaplasia apócrina	0	0
V022	76	T4bN2M0	Ductal Invasivo	20	110
V025	56	T4aN1M0	Ductal Invasivo	3	0
V040	53	T2N0M0	Ductal Invasivo	3	0

Tabela 17: Dados ginecológicos de pacientes que apresentaram instabilidade

<i>Paciente</i>	<i>Menarca</i>	<i>Telarca</i>	<i>Menopausa</i>	<i>Primeiro parto</i>	<i>Antecedentes ginecológicos</i>
V007	13	nd	50	30	G9P7A2
V022	13	12	40	29	G5P3A2
V025	11	12	46	-	Paciente virgem
V040	12	nd	45	28	G1P1A0

Tabela 18:: Antecedentes oncológicos de pacientes que apresentaram instabilidade

<i>Paciente</i>	<i>Antecedentes familiares</i>	<i>Antecedentes pessoais</i>
V007	Irmã: câncer de cabeça*	Sem antecedentes
V022	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V025	Sem antecedentes	Sem antecedentes
V040	Sem antecedentes	Sem antecedentes

* relato da própria paciente

Como é possível constatar, não parece existir correlação alguma entre os casos de instabilidade e quaisquer dos parâmetros clínicos/ ginecológicos disponíveis neste estudo. O fato da ocorrência elevada do tipo histológico ductal invasivo se deve basicamente a amostragem, onde o mesmo tipo ocorre em uma frequência alta (aproximadamente 80% de ocorrência). No entanto faz-se necessário notar que a falta de correlação pode ser devido a baixa amostragem do estudo.

Instabilidade Germinativa e Instabilidade Somática

Apesar da quantidade de estudos, os trabalhos atuais ainda não são conclusivos quando se tenta estabelecer um mecanismo comum para os fenômenos de instabilidade, que podem ser claramente separados em duas categorias distintas.

A primeira categoria inclui as doenças onde a instabilidade ocorreu na linhagem germinativa (*germline mutations*) e está presente em todas as células de um indivíduo. Como exemplo podemos citar a coréia de Huntington (HD), a distrofia miotônica (MD), ataxia espino-cerebelar (SCA) e a doença de Machado-Joseph (MJD), onde ocorre instabilidade em algum *locus* específico que, de alguma forma, acaba ocasionando a doença. Em todas estas doenças a instabilidade é constitucional, além de apresentarem várias características próprias deste grupo.

Dentre estas características temos o fato de que os microsátélites envolvidos com as doenças desta categoria são sempre trinucleotídeos (geralmente CAG/CTG - Wells, comunicação em congresso, 9TH INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS - BRASIL, 1996), o número de repetições aumentam com o passar das gerações e, em algumas das doenças este aumento está associado a um fenômeno de transmissão diferencial. Esta transmissão diferencial consiste na diferença existente entre os alelos transmitidos por cada um dos pais, com um padrão que lembra muito o *imprinting* (vide Introdução - Doenças correlacionadas).

A segunda categoria inclui todos os casos de instabilidade em cânceres de quaisquer natureza. Aqui temos mutações dinâmicas ocorrendo em apenas algumas populações de células do indivíduo doente, caracterizando a natureza somática da instabilidade para esta categoria. Porém, nestes casos, ao contrário do que ocorre com a primeira categoria, não se observa nenhum tipo de característica comum entre os diversos tipos de câncer, a não ser a própria instabilidade.

Todos estes fatos nos sugere que, apesar de ser possível detectar instabilidade de microsátélites nestas duas categorias, os mecanismos responsáveis por cada uma devem ser diferentes.

Até o presente momento não foi realizado nenhum estudo para se averiguar a ocorrência de instabilidade em *loci* arbitrários de microsátélites em pacientes que sofrem das doenças da primeira categoria, como coréia de Huntington, por exemplo. Assim um estudo desta natureza seria de extrema

importância para possibilitar a distinção definitiva entre as doenças envolvendo instabilidade de microsátélites. Uma vez diferenciados, os mecanismos propostos poderão ser revistos e melhor redefinidos para cada caso.

Perda de Heterozigosidade

Uma das características dos *loci* de microsátélites é a capacidade de ser utilizado como marcador e, desta maneira, evidenciar possíveis eventos de perda de heterozigosidade.

Os nossos resultados incluem apenas um evento de perda de heterozigosidade, no *locus* AR Xq11-12 da paciente V005. Comparando-se com os outros estudos, podemos verificar que este *locus* realmente apresenta perda de heterozigosidade (tabela 19). Porém vários outros *loci* analisados em outros estudos também mostraram perda de heterozigosidade, o que nos impossibilita sugerir que em câncer de mama apenas o *locus* AR Xq11-12 apresenta este fenômeno.

De qualquer maneira, a frequência de perda de heterozigosidade é insuficiente para se tentar correlacioná-la com a ocorrência de câncer de mama em si.

Tabela 19: Dados de perda de heterozigosidade no *locus* AR Xq11-12, em estudos prévios.

No.	Referências	Câncer	Amostragem	Perda de Heterozigosidade
1	Yee et al., 1994	Mama	20	3
2	Shridhar et al., 1994	Células não-pequenas do pulmão	38	1

Considerações Gerais.

Até este ponto analisamos as diferenças existentes em diversos microsátélites de alguns cromossomos. Não somente o nosso estudo, assim como os outros, se preocuparam em reportar a existência de um fenômeno recentemente constatado, porém ainda pouco compreendido. De alguma forma as alterações de microsátélites estão associadas a disfunções celulares, grande

parte ainda não esclarecidas. No entanto, existem alguns possíveis pontos onde alterações deste tipo podem ter repercussões importantes.

O problema se encontra no deslocamento de unidades de sequências funcionais, tais como as sequências regulatórias, que tem no posicionamento relativo a outras sequências uma questão crítica. Dependendo de onde se encontra um microsatélite susceptível de instabilidade, pode ocorrer um deslocamento de sequências que as colocaria fora da área de influência de uma sequência enhancer, por exemplo, resultando na diminuição de sua expressão e consequentes alterações no delicado equilíbrio celular existente. Além de enhancers, poderíamos também imaginar o desequilíbrio caso ocorresse instabilidade entre algum promotor de transcrição e o seu gene.

Um outro ponto onde a estabilidade de tais sequências seria indispensável se encontra nas sequências codificantes em si. Nesses casos existem vários aspectos que poderiam ser perturbados por uma instabilidade de microsatélite. O primeiro aspecto seria a possibilidade de alterações em sítios de splicing durante as etapas de processamento.

Além disso, aumento ou diminuição de repetições em sequências codificantes poderia, a princípio, sempre gerar proteínas deturpadas que podem perder as suas funções ou pelo menos parte de sua atividade, dependendo dos domínios afetados. Em muitos casos ocorre apenas danos em um ou outro domínio afetado pela instabilidade, porém existem casos em que a proteína segue um posicionamento preciso de alguns aminoácidos. Estes aminoácidos são extremamente críticos e geralmente dependem do ângulo que se encontram em relação a um outro aminoácido. Como a posição que este se encontra depende da interação precisa de todos os aminoácidos que estão presentes na proteína, qualquer perturbação deste equilíbrio impediria este alinhamento perfeito, suficiente para resultar em uma proteína totalmente diferente da original.

Até o momento somente uma proteína, envolvida na doença DRPLA (*dentatorubral pallidoluysian atrophy*), mostrou aumentar a atividade enzimática em casos de instabilidade de microsatélite no respectivo gene (Tsuji, comunicação em congresso, 9TH INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS - BRASIL, 1996)

Quanto aos cânceres, ainda não se tem uma idéia precisa do papel que instabilidade de microsatélites teriam neste processo. Podem tanto ser indicativos de que a instabilidade ocorre e atinge mecanismos de carcinogênese ainda desconhecidos, assim como resultantes de um mesmo mecanismo que desencadeia o câncer e a instabilidade ao mesmo tempo.

Uma vez que os dados iniciais já foram produzidos, faz-se necessário agora tentar elucidar os mecanismos que origina estas instabilidades, que acreditamos ser diversos e com características distintas.

Microsatélites são pequenas (1 a 8 nucleotídeos) seqüências de DNA repetidas em *tandem*. A Instabilidade de Microsatélites (MI) é caracterizada como variações no número de repetições de um determinado microsatélite entre um genoma normal e um genoma mutado. Foi primeiramente descrita em diversas doenças neurodegenerativas, como a coréia de Huntington e a ataxia espino-cerebelar. Mais recentemente, instabilidade de microsatélite foi observado em câncer colorectal e outros tipos de cânceres. O objetivo deste estudo foi determinar a presença e a freqüência de instabilidade de microsatélite em tumores de mama obtidos do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (CAISM - UNICAMP), em Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Nós analisamos quatro *loci* de microsatélites: uma repetição de dinucleotídeos (CA)_n localizada no cromossomo 17 (D17S807), uma outra repetição de dinucleotídeos (CA)_n localizada no cromossomo 10 (D10S89), uma repetição de trinucleotídeos (CAG)_n localizada na região codificante do gene de receptor de andrógenos e uma repetição de trinucleotídeos (CAA)_n localizado em uma região codificante anônima localizada no cromossomo 2. As amostras foram examinadas para se verificar alterações genéticas, usando PCR com primers específicos para as regiões de microsatélite citadas. Nossos resultados mostram eventos de instabilidade de maneira constante, porém de baixa freqüência (12,5% ao todo). Comparações com outros estudos mostram que a instabilidade em câncer de mama, diferentemente de outros tipos de câncer, é freqüente porém baixa também (em concordância com os nossos dados). No entanto, ao se analisar sob o aspecto de instabilidade relativa por *locus*, verificamos uma taxa relativamente alta, que pode indicar uma nova forma de se entender as taxas de instabilidade.

SUMMARY

Microsatellite are small (1 to 8 nucleotide) repeated sequences of DNA arranged in *tandem*. Microsatellite Instability (MI) is characterized as a variation on the number of repeats of a determined microsatellite between a normal genome and a mutated one. It was first described in several neurodegenerative diseases, such as Huntington's Disease and spino-cerebellar ataxia. Most recently MI has been observed in colorectal and other cancers. The purpose of this study was to determine the presence and the frequency of MI in breast tumors obtained from CAISM Hospital, Campinas, São Paulo, Brazil. We analysed four microsatellite *loci*: a dinucleotide repeat (CA)_n located on chromosome 17 (D17S807), another dinucleotide repeat (CA)_n located on chromosome 10, a trinucleotide repeat (CAG)_n located in the coding region of the androgen receptor gene and a trinucleotide repeat (CAA)_n located in an anonymous coding region from chromosome 2. The samples were examined for genetic alterations by PCR using specific primers for microsatellite regions. Our results shows low, but constant (about 12,5 % altogether) microsatellite instability events, although having a relatively high instability rate per *locus*. Comparisons with other studies shows that microsatellite instability in breast cancer, differently of other cancers, are low, but constant too (agreeing with our results). But when considering the relative instability rate per *locus* , our results are significantly high.

BIBLIOGRAFIA

- AALTONEN, L.A.; PELTOMÄKI, P.; MECKLIN, J.-P.; JÄRVINEN, H.; JASS, J.R.; GREEN, J.S.; LYNCH, H.T.; WATSON, P.; TALLQVIST, G.; JUHOLA, M.; SISTONEN, P.; HAMILTON, S.R.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. AND DE LA CHAPELLE, A. Replication errors in benign and malignant tumours from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Research*, **54**: 1645, 1994.
- ADAMI, H.; HANSEN, J.; JUNG, B. AND RIMSTEN, H. Characteristics of familial breast cancer in Sweden.. *Cancer*, **48**: 1688, 1981.
- ALBANES, D. Total calories, body weight and tumor incidence in mice.. *Cancer Research*, **47**: 1987, 1987.
- ANDERSON, D.E. AND BADZIOCH, M.D. Risk of familial breast cancer.. *Cancer*, **56**: 383, 1985.
- BALLARD-BARBASH, R.; SCHATZKIN, A.; CARTER, C.L.; KANNEL, W.B.; KREGER, B.E.; D'AGOSTINO, R.B.; SPLANSKY, G.L.; ANDERSON, K.M. AND HELSEL, W.E. Body fat distribution and breast cancer in the Framingham study.. *Journal of National Cancer Institute*, **82**: 286, 1990.
- BANFI, S.; SERVADIO, A.; CHUNG, M.Y.; KWIATKOWSKI, T.J.J.; MCCALL, A.E.; DUVICK, L.A.; YING S.; ROTH, E.J.; ORR, H.T. AND ZOGHBI, H.Y. Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature Genetics*, **7**: 513, 1994.
- BERGKVIST, L.; ADAMI, H.-H.; PERSSON, I.; HOOVER, R. AND SCHAIRER, C. The risk of breast cancer after estrogen-progestin replacement.. *New England Journal of Medicine*, **321**: 293, 1989.
- BERGTHORSSON, J.T.; EGILSSON, V.; GUDMUNDSSON, J.; ARASON, A. AND INGVARSSON, S. Identification of a breast tumor with microsatellite instability in a potential carrier of the hereditary non-polyposis colon cancer trait. *Clinical Genetics*, **47**: 305, 1995.
- BERNSTEIN, L.; ROSS, R.K.; LOBO, R.A.; HANISCH, R.; KRAILO, M.D. AND HENDERSON, B.E. The effects of moderate physical activity on menstrual cycle patterns in adolescence: implications for breast cancer prevention.. *British Journal of Cancer*, **55**: 681, 1987.
- BISHOP, J.M. The molecular genetics of cancer. *Science*, **235**: 305, 1987.
- BOWCOCK, A.W.; ANDERSON, L.A.; FRIEDMAN, L.S.; BLACK, D.M.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; ROWELL, S.E.; HALL, J.M.; SOLOMON, E. AND KING, M.-C. THRA I and D17S183 flank an interval of <4cM for the breast-ovarian cancer gene (BRCA I) on chromosome 17q21. *American Journal of Human Genetics*, **52**: 718, 1993.

- BRINTON, L.A.; HOOVER, R. AND FRAUMENI, J.F.J. Menopausal oestrogens and breast cancer risk: an expanded case-control study.. *British Journal of Cancer*, **54**: 825, 1986.
- BRUNNER, H.G.; BRÜGGENWIRTH, H.T.; NILLESEN, W.; JANSEN, G.; HAMEL, B.C.J.; HOPPE, R.L.E.; DE DIE, C.E.M.; HÖWELER, C.J.; VAN OOST, B.A.; WIERINGA, B.; ROPERS, H.H. AND SMEETS, H.J.M. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *American Journal of Human Genetics*, **53**: 1016, 1993.
- BUELL, P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women.. *Journal of National Cancer Institute*, **51**: 1479, 1973.
- BURING, J.E.; HENNEKENS, C.H.; LIPNICK, R.J.; WILLETT, W.; STAMPFER, M.J.; ROSNER, B.; PETO, R. AND SPEIZER, F.E. A prospective cohort study of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer in US women.. *American Journal of Epidemiology*, **125**: 939, 1987.
- BURKS, R.T.; KESSIS, T.D.; CHO, K.R. AND HEDRICK, L. Microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Oncogene*, **9**: 1163, 1994.
- CLAUS, E.B.; THOMPSON, W.D. AND RISCH, N. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American Journal of Human Genetics*, **48**: 232, 1991.
- CONTEGIACOMO, A.; PALMIROTTA, R.; DE MARCHIS, L.; PIZZI, C.; MASTRANZO, P.; DELRIO, P.; PETRELLA, G.; FIGLIOLINI, M.; BIANCO, A.R.; FRATI, L.; CAMA, A. AND MARIANI-COSTANTINI, R. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *International Journal of Cancer*, **64**: 264, 1995.
- DAVIES, K.E., 1989. **The fragile X syndrome 1st. ed.**.. Oxford University Press - Oxford/UK.
- DUPONT, W.D.; PAGE, D.L.; ROGERS, L.W. AND PARL, F.F. Influence of exogenous estrogens, proliferative breast disease, and other variables on breast cancer risk. *Cancer*, **63**: 948, 1989.
- EICHLER, E.E.; HOLDEN, J.J.A.; POPOVICH, B.W.; REISS, A.L.; SNOW, K.; THIBODEAU, S.N.; RICHARDS, C.S.; WARD, P.A. AND NELSON, D.L. Length of interrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genetics*, **8**: 88, 1994.
- FISHEL, R.; EWEL, A.; LEE, S.; LESCOE, M.K. AND GRIFFITH, J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science*, **266**: 1403, 1994.
- FISHEL, R.; LESCOE, M.K.; RAO, M.R.S.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; GARBER, J.; KANE, M. AND KOLODNER, R.D. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, **75**: 1027, 1993.

- FISHER, E.R.; GREGORIO, R.M.; FISHER, B.; REDMOND, C.; VELLIOS, F. AND SOMMERS, S.C. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol No. 4).. *Cancer*, **36**: 1, 1975.
- FRANKS, L.M. AND TEICH, N., 1990. **Introdução biologia celular e molecular do câncer 1ª. ed.** Livraria Roca - São Paulo.
- FRIEND, S.; DRYJA, T.P. AND WEINBERG, R.A. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *The New England Journal of Medicine*, **318**: 618, 1988.
- GLASS, A.G. AND HOOVER, R.N. Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status.. *Journal of National Cancer Institute*, **82**: 693, 1990.
- GOLDBERG, Y.P.; KREMER, B.; ANDREW, S.E.; THIBODEAU, S.N.; GRAHAM, R.K.; SQUITIERI, F.; TELENUS, H.; ADAM, S.; SAJOO, A.; STARR, E.; HEIBERG, A.; WOLFF, G. AND HAYDEN, M.R. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nature Genetics*, **5**: 174, 1993.
- GRAY, G.E.; PIKE, M.C. AND HENDERSON, B.E. Breast cancer incidence and mortality rates in different countries in relation to known risk factors and dietary practices.. *British Journal of Cancer*, **39**: 1, 1979.
- HALL, J.M.; LEE, M.K. AND NEUMAN, B. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, **250**: 1684, 1990.
- HARPER, P., 1989. **Myotonic dystrophy 2nd ed.** W.B. Saunders Co. - London.
- HAUGE, X.Y. AND LITT, M. A study of the origin of "shadow bands" seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR.. *Human Molecular Genetics*, **2**: 411, 1993.
- HENDERSON, B.E.; ROSS, R.K. AND BERNSTEIN, L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture.. *Cancer Research*, **48**: 246, 1988.
- HENDERSON, B.E.; ROSS, R.K.; JUDD, H.L.; KRAILO, M.D. AND PIKE, M.C. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk ?. *Cancer*, **56**: 1206, 1985.
- HERSHCOPF, R.J. AND BRADLOW, H.L. Obesity, diet, endogenous estrogens, and the risk of hormone-sensitive cancer.. *American Journal of Clinical Nutrition*, **45**: 283, 1987.
- HOLMES, J.; CLARK, S. AND MODRICH, P. Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines.. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **87**: 5831, 1990.
- HONCHEL, R.; HALLING, K.C.; SCHAID, D.J.; PITTELKOW, M. AND THIBODEAU, S.N. Microsatellite instability in Muir-Torre syndrome. *Cancer Research*, **54**: 1159, 1994.

- HORII, A.; HAN, H.-J.; SHIMADA, M.; YANAGISAWA, A.; KATO, Y.; OHTA, H.; YASUI, W.; TAHARA, E. AND NAKAMURA, Y. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Research*, **54**: 3373, 1994.
- INGRAM, D.; NOTTAGE, E.; NG, S.; SPARROW, L.; ROBERTS, A. AND WILCOX, D. Obesity and breast disease. The role of female sex hormones.. *Cancer*, **64**: 1049, 1989.
- IONOV, Y.; PEINADO, M.A.; MALKHOSYAN, S.; SHIBATA, D. AND PERUCHO, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, **363**: 558, 1993.
- IP, C. AND IP, M.M. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene - induced mammary tumors as influenced by dietary fat.. *Journal of National Cancer Institute*, **66**: 291, 1981.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. AND SWEE, L.T. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67, 1985.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; NEUMANN, R. AND KEYTE, J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: toward DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, **16**: 10953, 1988.
- KELSEY, J.L. AND BERKOWITZ, G.S. Breast cancer epidemiology. *Cancer Research*, **48**: 5615, 1988.
- KING, B.L.; CARCANGIU, M.L.; CARTER, D.; PFISTERER, J. AND KACINSKI, B.M. Microsatellite instability in ovarian neoplasms. *British Journal of Cancer*, **72**: 376, 1995.
- KLEIN, G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*, **238**: 1539, 1987.
- LEACH, F.S.; NICOLAIDES, N.C.; PAPADOPOULOS, N.; LIU, B.; JEN, J.; PARSONS, R.E.; PELTOMÄKI, P.; SISTONEN, P.; AALTONEN, L.A.; NYSTRÖM-LAHTI, M.; GUAN, X.-Y.; ZHANG, J.; MELTZER, P.S.; YU, J.-W.; KAO, F.-T.; CHEN, D.J.; CEROSALETTI, K.M.; FOURNIER, R.E.K.; TODD, S.; LEWIS, T. ET AL. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, **75**: 1215, 1993.
- LEWIN, B. *Genes V 1st ed.* Oxford University Press - Oxford/ UK.
- LIN, J.T.; WU, M.S.; SHUN, C.T.; LEE, W.J.; SHEU, J.C. AND WANG, T.H. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. *Cancer Research*, **55**: 1428, 1995.
- LIN, Z.; LEEFLANG, P.; JIAN, Y. AND ARNHEIM, N. Studying human mutations by sperm typing: instability of CAG trinucleotide repeats in the human androgen receptor gene. *Nature Genetics*, **7**: 531, 1994.
- LITT, M. AND LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 397, 1989.

- MACMAHON, B.; COLE, P. AND BROWN, J. Etiology of human breast cancer: a review.. *Journal of National Cancer Institute*, **50**: 21, 1973.
- MACMAHON, B.; TRICHOPOULOS, D.; BROWN, J.; ANDERSEN, A.P.; AOKI, K.; COLE, P.; DEWAARD, F.; KAURANIEME, T.; MORGAN, R.W.; PURDE, M.; RAVNIHAR, B.; STORMBY, N.; WESTLUND, K. AND WOO, N.-C. Age at menarch, probability of ovulation and breast cancer risk.. *International Journal of Cancer*, **29**: 13, 1982.
- MELTZER, S.J.; JING Y.; MANIN, B.; RHYU, M.-G.; COTTRELL, J.; HUDSON, E.; REDD, J.L.; KRASNA, M.J.; ABRAHAM, J.M. AND REID, B.J. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's-associated esophageal adenocarcinomas. *Cancer Research*, **54**: 3379, 1994.
- MERLO, A.; MABRY, M.; GABRIELSON, E.; VOLLMER, R.; BAYLIN, S.B. AND SIDRANSKY, D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Research*, **54**: 2098, 1994.
- MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; ANDREW FUTREAL, P.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q. AND SKOLNICK, M.H. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**: 66, 1994.
- MILLER, A.B. AND BULBROOK, R.D. UICC multidisciplinary project on breast cancer: the epidemiology, aetiology and prevention of breast cancer.. *International Journal of Cancer*, **37**: 173, 1986.
- MILLS, P.K.; BEESON, L.; PHILLIPS, R.L. AND FRASER, G.E. Dietary habits and breast cancer incidence among Seventh-Day Adventists.. *Cancer*, **64**: 582, 1989.
- NAROD, S.A.; FEUNTEUN, J. AND LYNCH, H.T..Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet*, **338**: 82, 1991.
- NICOLAIDES, N.C.; PAPADOPOULOS, N.; LIU, B.; WEI, Y.-F.; CARTER, K.C.; RUBEN, S.M.; ROSEN, C.A.; HASELTINE, W.A.; FLEISHMANN, R.D.; FRASER, C.M.; ADAMS, M.D.; VENTER, J.C.; DUNLOP, M.G.; HAMILTON, S.R.; PETERSEN, G.M.; DE LA CHAPELLE, A.; VOGELSTEIN, B. AND KINZLER, K.W. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, **371**: 75, 1994.
- NIH concensus development conference on early-stage breast cancer.. *June*, **18 - 21**: 1990.
- NOWAK, R. Breast cancer offers surprises. *Science*, **265**: 1796, 1994.
- OLSSON, H.; MOLLER, T.R. AND RANSTAM, J. Early oral contraceptive use and breast cancer among premenopausal women: final report from a study in Southern Sweden.. *Journal of National Cancer Institute*, **81**: 1000, 1989.
- OTTMAN, R.; KING, M.C.; PIKE, M.C. AND HENDERSON, B.E. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer.. *Lancet*, **2**: 556, 1983.

- PAPADOPOULOS, N.; NICOLAIDES, N.C.; WEI, Y.-F.; RUBEN, S.M.; CARTER, K.C.; ROSEN, C.A.; HASELTINE, W.A.; FLEISHMANN, R.D.; FRASER, C.M.; ADAMS, M.D.; VENTER, J.C.; HAMILTON, S.R.; PETERSEN, G.M.; WATSON, P.; LYNCH, H.T.; PELTOMÄKI, P.; MECKLIN, J.-P.; DE LA CHAPELLE, A.; KINZLER, K.W. AND VOGELSTEIN, B. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, **263**: 1625, 1994.
- PARKIN, D.M.; LAARA, E. AND MUIR, C.S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *International Journal of Cancer*, **41**: 184, 1988.
- PATEL, U.; GRUNDFEST-BRONIATOWSKI, S.; GUPTA, M. AND BANERJEE, S. Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene*, **9**: 3695, 1994.
- PELTOMÄKI, P.; P., LOTHE, R.A.; AALTONEN, L.A.; PYLKKÄNEN, L.; NYSTRÖM-LAHTI, M.; SERUCA, R.; DAVID, L.; HOLM, R.; RYBERG, D.; HAUGEN, A.; BROGGER, A.; BORRESEN, A.-L. AND DE LA CHAPELLE, A. Microsatellite instability is associated with tumours that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome.. *Cancer Research*, **53**: 5853, 1993.
- PIKE, M.C.; HENDERSON, B.E.; CASAGRANDE, J.T.; ROSARIO, I. AND GRAY, G.E. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women.. *British Journal of Cancer*, **43**: 72, 1981.
- PONDER, B.A.J. Inherited predisposition to cancer. *Trends in Genetics*, **6**: 1990.
- PRENTICE, R.; THOMPSON, D.; CLIFFORD, C.; GORBACH, S.; GOLDIN, B. AND BYAR, D. Dietary fat reduction and plasma estradiol concentration in healthy postmenopausal women.. *Journal of National Cancer Institute*, **82**: 129, 1990.
- PRENTICE, R.L.; PEPE, M. AND SELF, S.G. Dietary fat and breast cancer: a quantitative assessment of the epidemiological literature and a discussion of methodological issues.. *Cancer Research*, **49**: 3147, 1989.
- PROLLA, T.A.; PANG, Q.; ALANI, E.; KOLODNER, R.D. AND LISKAY, R.M. MLH1, PMS1 and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast.. *Science*, **265**: 1091, 1994.
- RHYU, M.-G.; PARK, W.-S. AND MELTZER, S.J. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*, **9**: 29, 1994.
- RICHARDS, R.I. AND SUTHERLAND, G.R. Dynamic mutations: A new class of mutations causing human disease. *Cell*, **70**: 709, 1992.
- RICKE, D.O.; LIU, Q.; GOSTOUT, B. AND SOMMER, S.S. Nonrandom patterns of simple and cryptic triplets repeats in coding and noncoding sequences. *Genomics*, **26**: 510, 1995.
- RISINGER, J.I.; BERCHUCK, A.; KOHLER, M.F.; WATSON, P.; LYNCH, H.T. AND BOYD, J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Research*, **53**: 5100, 1994.

- SAGER, R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, **246**: 1406, 1989.
- SARACCI, R. AND REPETTO, F. Epidemiology of breast cancer.. *Semin. Oncol.*, **5**: 342, 1978.
- SEIDMAN, H. Cancer of the breast: statistical and epidemiology data.. *Cancer*, **24**: 1355, 1969.
- SHRIDHAR, V.; SIEGFRIED, J.; HUNT, J.; ALONSO, M.M. AND SMITH, D.I. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research*, **54**: 2084, 1994.
- SHRIDHAR, V.; SIEGFRIED, J.; HUNT, J.; ALONSO, M.M. AND SMITH, D.I. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research*, **54**: 2084, 1994.
- SILVERBERG, E.; BORING, C.C. AND SQUIRES, T.S. Cancer statistics, 1990.. *CA*, **40**: 9, 1990.
- SIMARD, J.; FEUNTEUN, J. AND LENOIR, G. Genetic mapping of the breast-ovarian cancer syndrome to a small interval on chromosome 17q12-21: exclusion of candidate genes EDH17B2 and RARA *Human Molecular Genetics*, **2**: 1193, 1993.
- SOMMER, S.S.; TILLOTSON, V.L. AND VIELHABER, E.L. "Cryptic" dinucleotide polymorphisms in the 3' region of the factor IX gene shows substantial variation among different populations.. *Human Genetics*, **93**: 357, 1994.
- STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M. AND PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair.. *Nature*, **365**: 274, 1993.
- STRATTON, M.R.; FORD, D.; NEUHASSEN, S.; SEAL, S.; WOOSTER, R.; FRIEDMAN, L.S.; KING, M.-C.; EGILSSON, V.; DEVILLE, P. AND MCMANUS, R. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nature Genetics*, **7**: 103, 1994.
- STRATTON, M.R. Recent advances in understanding of genetic susceptibility to breast cancer. *Human Molecular Genetics*, **5**: 1515, 1996.
- TAVTIGIAN, S.V.; SIMARD, J.; ROMMENS, J.; COUCH, F.; SHATTUCK EIDENS, D.; NEUHASSEN, S.; MERAJVER, S.; THORLACIUS, S.; OFFIT, K.; STOPPA LYONNET, D.; BELANGER, C.; BELL, R.; BERRY, S.; BOGDEN, R.; CHEN, Q.; DAVIS, T.; DUMONT, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; JAMMULAPATI, S.; JANECKI, T.; JIANG, P.; KEHRER, R.; LEBLANC, J.F.; GOLDFAR, D.E. *et al.* The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics*, **12**: 333, 1996.
- TELENIUS, H.; KREMER, H.B.H.; THEILMANN, J.; ANDREW, S.E.; ALMQVIST, E.; ANVRET, M.; GREENBERG, C.; GREENBERG, J.; LUCOTTE, G.; SQUITIERI, F.; STARR, E.; GOLDBERG, Y.P. AND HAYDEN, M.R. Molecular analysis of juvenile Huntington's disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Human Molecular Genetics*, **2**: 1535, 1993.

- TENAN, M.; COLOMBO, B.M.; POLLO, B.; CAJOLA, L.; BROGGI, G. AND FINOCCHIARO, G. p53 mutations and microsatellite analysis of loss of heterozygosity in malignant gliomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **74**: 139, 1994.
- THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESERCH GROUP A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's Disease chromosomes. *Cell*, **72**: 971, 1993.
- THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R. AND WILLARD, H.F., 1993. **Genética Médica 5^a**. ed. Editora Guanabara Koogan - Rio de Janeiro.
- UCHIDA, T.; WADA, C.; WANG, C.; EGAWA, S.; OHTANI, H. AND KOSHIBA, K. Genomic instability of microsatellite repeats and mutations of H-, K-, and N-ras, and p53 genes in renal cell carcinoma. *Cancer Research*, **54**: 3682, 1994.
- UK NATIONAL CASE-CONTROL STUDY GROUP Oral contraceptive use and breast cancer risk in young women.. *Lancet*, **1**: 973, 1989.
- UICC - UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CANCER, 1989. **TNM - Classificação dos tumores malignos 4^a**. ed. Centro de Documentação do Ministério da Saúde - Brasília.
- VERMIGLIO, F.; SCHLUMBERGER, M.; LAZAR, V.; LEFRERÉ, I. AND BRESSAC, B. Absence of microsatellite instability in thyroid carcinomas. *European Journal of Cancer*, **31A**: 128, 1995.
- WEBER, J.L. AND MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388, 1989.
- WEISSENBAACH, J. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, **356**: 794, 1992.
- WHITE, E.; DALING, J.R.; NORSTED, T.L. AND CHU, J. Rising incidence of breast cancer among young women in Washington State.. *Journal of National Cancer Institute*, **79**: 239, 1987.
- WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.C.; ROSNER, B.A.; HENNEKENS, C.H. AND SPEIZER, F.E. Dietary fat and the risk of breast cancer.. *New England Journal of Medicine*, **316**: 22, 1987.
- WOOSTER, R.; CLETON-JANSEN, A.-M.; COLLINS, N.; MANGION, J.; CORNELIS, R.S.; COOPER, C.S.; GUSTERSON, B.A.; PONDER, B.A.J.; VON DEIMLING, A.; WEISTLER, O.D.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. AND STRATTON, M.R. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics*, **6**: 152, 1994.
- WOOSTER, R.; NEUHASSEN, S.L.; MANGION, J.; QUIRK, Y.; FORD, D.; COLLINS, N.; NGUYEN, K.; SEAL, S.; TRAN, T.; AVERILL, D. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, **256**: 2088, 1994.

- WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, **378**: 789, 1995.
- YEE, C.J.; ROODI, N.; VERRIER, C.S. AND PARL, F.F. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research*, **54**: 1641, 1994.



'Em cima e em baixo', M.C. Escher - 1947