

***ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM FIBROADENOMAS
DE MAMA***

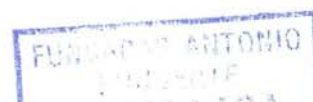
MARÍLIA SILVA DE SOUZA TAKIMOTO

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a.
MARIA APARECIDA NAGAI

São Paulo
2000



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A.C. Camargo

Takimoto, Marília Silva de Souza

Alterações genéticas em fibroadenomas de mama / Marília Silva de Souza
Takimoto -- São Paulo, 2000.

p. 94

Dissertação(mestrado)Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Nagai

Descritores: 1. FIBROADENOMA/patologia. 2. MAMA/patologia. 3.
GENÉTICA/análise. 4. DISSECÇÃO/técnica. 5. CROMOSSOMO HUMANO 3.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Everardo e Marlene, e sogros, Yatsutsura e Donieta, pelo amor, dedicação e compreensão.

À Ana Cecília, Sérgio, Everardo Jr., Ricardo Kioshi Roberto Massao, pela amizade e carinho.

Ao Nario, pelo amor, respeito e companheirismo de todas às horas, proporcionando-me o equilíbrio, para que eu realize a minha programação existencial.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, pelo empenho, orientação e incentivo na elaboração desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, chefe do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por permitir o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Flávia Logullo, pela demonstração da técnica de microdissecção de tecidos.

À Dra. Regina Felippo Barboza, pela paciência, atenção e esmero no desenvolvimento e ensino das técnicas de microdissecção e acompanhamento das análises anatomopatológicas.

Ao Leandro Pereira Braga, pela colaboração na confecção das lâminas anatomopatológicas.

Ao Dr. Carlos Alberto Ruiz, médico mastologista, responsável pelo desenvolvimento do trabalho no Centro de Referência da Saúde da Mulher, Nutrição, Alimentação e Desenvolvimento Infantil (Hospital Pérola Byington).

AGRADECIMENTOS

À Maria Cristina Peñeiro Grandal e à Marisa Melo, pelo auxílio na confecção de figuras, fotos e microfotografias.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular de Câncer: **Alessandra Simões Bassini, Antônio Maria Nunes de Lima, Celso Abdon Lopes Mello, Claudia Ferreira de Sousa, Claudia Malheiros Coutinho, Denilson Contado, Elisabete Cristina Miracca, Lidia Yamamoto, Márcio Luís Acêncio, Marcilei Eliza Buim, Mariana Lopes dos Santos, Michelle Regina Pavão, Nancy da Rós, Renata Hanae Nagai, Sibeli Salaorni, Simone Aparecida de Bessa, Tatiana Taís Sibov**, pela amizade e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia da FMUSP, em especial: **À Dra. Shigueko S. T. Pueyo, Maria Cristina Audi Brada, Benedita Aparecida R.C. Halfon, Dr. Igor Moyses Longo Snitcovsky**, pelo convívio e amizade.

À Sra. Maria José Gonçalves Benevides, pela dedicação que sempre pude contar.

À Sra. Ana Maria Alves Kuninari pela eficiência, organização e profissionalismo.

À Srta. Marcia Miwa Hiratani pela dedicação diária.

AGRADECIMENTOS

À Inês Nobuko Nishimoto pela orientação epidemiológica.

Aos funcionários da biblioteca da FMUSP, da BIREME e do Hospital do Câncer, em especial **à Sueli Francisco, Rosinéia Aguiar Carneiro, ao Anselmo F.P.O. Sousa e ao Renato Benhossi.**

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Alfredo Carlos S. D. Barros, Prof. Dr. Jorge Sabagga, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Marques e a Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith, pelas críticas, sempre construtivas e pelas orientações.

Ao corpo discente e docente da pós graduação. Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade e Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis, pela dedicação e competência na implantação e desenvolvimento da pós graduação e formação de novos pesquisadores e docentes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, pela oportunidade de desfrutarmos de um Centro de Excelência em Ensino e Saúde.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Justo da Silva e ao Dr. Sérgio Trindade Müller,
pelas oportunidades de conhecimento e pelo exemplo na minha formação acadêmica
e profissional.

À FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado, para realização desse trabalho.

**Às pacientes e aos funcionários do Hospital Pérola Byington, Faculdade de
Medicina da USP, Hospital do Câncer A.C.Camargo e Instituto Ludwig de
Pesquisa para o Câncer-SP.**

E à todos, que direta ou indiretamente contribuíram na realização desse trabalho.

RESUMO

TAKIMOTO MSS. **Alterações Genéticas em Fibroadenomas de Mama.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente].

O Fibroadenoma é o tumor benigno mais comum na mama. Ocorre em qualquer idade, principalmente em mulheres jovens, na faixa etária entre 20 e 30 anos. Este tumor apresenta componentes epiteliais e estromais. A história natural, clássica de fibroadenoma de mama, é de um nódulo de crescimento lento, bem delimitado e móvel em relação ao tecido de mama adjacente. O fibroadenoma pode ser único ou múltiplo, unilateral ou bilateral e variar de tamanho, podendo atingir grandes proporções, mas a maioria apresenta de 2 a 6 cm.

Através da análise de dados epidemiológicos, observaram-se que pacientes com fibroadenomas de mama apresentavam um risco relativo aumentado de desenvolverem câncer de mama. O risco eleva-se em pacientes com fibroadenomas complexos, doença proliferativa e história familiar de câncer.

A etiologia do fibroadenoma de mama permanece desconhecida. Estudos têm sido realizados para identificar os eventos moleculares que podem estar envolvidos na etiopatologia destes tumores. A maioria destes estudos são citogenéticos. Existem poucos estudos moleculares em fibroadenoma de mama. A policlonalidade deste tumor é um dos aspectos que deve ser considerado.

RESUMO

Neste estudo, analisamos 52 amostras de fibroadenoma de mama, fixadas em formol e emblocadas em parafina. Depois do diagnóstico de fibroadenoma simples de mama, confeccionou-se lâminas coradas pela Eosina e procedeu-se a microdissecção de tecidos. Separamos e analisamos todos os componentes do fibroadenoma (epitélio e estroma) e tecido normal adjacente. A extração de DNA genômico foi realizada para todos estes tecidos. A análise de perda de heterozigose foi realizada, utilizando-se 12 marcadores de DNA altamente polimórficos do tipo microssatélite, para o estudo das regiões cromossômicas 3p, 6q, 10q, 11p, 11q, 17p e 17q.

Esta pesquisa evidenciou perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 em três amostras de fibroadenoma simples. Neste estudo avaliamos cada componente celular do fibroadenoma simples de mama, e demonstramos a ocorrência de perda de heterozigose na região cromossômica 3p13, sugerindo que esta região esteja implicada na gênese do fibroadenoma de mama.

Descritores: Fibroadenoma de Mama, Perda de Heterozigose, Alterações Genéticas,

Técnica de Microdissecção, Análise de Microssatélites, Cromossomo 3.

SUMMARY

TAKIMOTO MSS. **Alterações Genéticas em Fibroadenomas de Mama.** [Genetics Alterations of Breast Fibroadenomas]. São Paulo (BR); 2000. [Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente].

Fibroadenoma represents the most common benign tumor of the breast. It occurs at any age, but mainly in young women, between 20 to 30 years. This tumor has both epithelial and stromal components. The natural history of classical fibroadenoma is characterized by the development of a well-delimited and mobile node with slow growth. This tumor can be single or multiple, unilateral or bilateral, varying largely in proportions, but the majority has 2 to 6 cm.

Epidemiological data have shown an increased relative risk to develop breast cancer in patients with fibroadenoma. This relative risk is higher among patients with complex fibroadenoma, benign proliferative disease and family history of breast cancer.

The etiology of breast fibroadenoma remains unclear. Some cytogenetics studies have been performed to clarify the molecular events that should be involved in the etiopathology of these tumors. However, there is few molecular analysis of breast fibroadenoma. The polyclonality of this tumor should be considered.

SUMMARY

We have studied 52 formalin fixed paraffin embedded samples of breast fibroadenoma. After the confirmation of diagnosis, slides stained with Eosin and were prepared to microdissection technique. We separated and analyzed all the components of fibroadenoma (epithelium and stroma) and also adjacent normal tissue. Genomic DNA was extracted from all these tissues and analyzed for loss of heterozygosity, using 12 polymorphic microsatellites markers mapped on chromosomal regions 3p, 6q, 10q, 11p, 11q, 17p and 17q.

Loss of heterozygosity in the short arm of chromosome 3 was observed in samples of 3 different tumors. Therefore, this study shows loss of heterozygosity in simple breast fibroadenoma on chromosomal region 3p13.

Our results suggests that the chromosomal region 3p13 might harbor putative tumor suppressor gene(s) involved in the genesis of breast fibroadenoma.

Descriptors: Breast Fibroadenoma, Loss of Heterozygosity, Genetic Alterations, Microdissection Technique, Microsatellite Analysis, Chromosome 3.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATM – *Ataxia-telangectasia mutated* (gene *ATM*)

APC – *Adenomatous Polyposis Coli* - (gene supressor de tumor).

ANDI - *Aberrations of normal development and involution* (alteração do desenvolvimento e involução).

bp – *base pair* (par de bases - pb)

BRCA – *Breast Cancer* – (gene *BRCA 1 / BRCA 2*)

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Soro de Albumina Bovina)

°C – graus Celsius

c-H-ras, *c-K-ras*, *c-N-ras* – genes da família *ras*

CIS – *Carcinoma in situ*

cm – centímetro

del - deleção

der – cromossomo derivado

DNA – ácido desoxirribonucléico

DCC – *Deleted in Colorectal Cancer* – (Deletado em carcinoma colorretal - gene)

dCTP – deoxicitosina trifosfato

dNTP – deoxinucleotídeo trifosfato

DUTT1 – gene supressor de tumor

(E) – Epitélio

EDTA – ácido etileno diamino tetra acético

erbB2 – proto-oncogene

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

et al – *et alli*. – e colaboradores

FA – Fibroadenoma de mama

FHIT – *Fragile Histidine Triad* (gene supressor de tumor)

FISH – *Fluorescence in situ hybridization* (Hibridização *in situ* com fluorescência)

g – grama

H19 – gene

HCl – ácido clorídrico

HE – Hematoxilina – Eosina

HNPCC – *Hereditary non - polyposis colorectal cancer* (Câncer colorretal

hereditário sem polipose)

hML1, *hMSH2*, *hMSH6*, *hMPMS1* e *hMPMS2* – genes de reparo de DNA

IGF II – *Insulin-like growth factor II* (Fator de crescimento semelhante à insulina II)

int2 – proto-oncogene

Kb – kilobase

KCl – Cloreto de potássio

kDa – kilodalton

l – litro

LOH – *loss of heterozygosity* (perda de heterozigose)

mar – cromossomo marcador

M – molar

mA – miliAmpère

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

mCi – miliCurie, Curie= $2,2 \times 10^{12}$ desintegrações por minuto

mg – miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

ml – mililitro

mol/l – mol por litro

mm – milímetro

mM – milimolar

myb e myc – proto-oncogenes

n - número

(N) – tecido normal

ng – nanograma

nm – nanômetro

nm23 – refere-se ao gene anti-metástase

P – fósforo

p – braço curto de um cromossomo

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

pRB – refere-se à proteína

PSA – persulfato de amônia

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

p53 – refere-se à proteína

q – braço longo de um cromossomo

Rb – Retinoblastoma – refere-se ao gene

r – cromossomo em anel

RLFP – *Restrict fragment length polymorphism* (Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição)

RNA – ácido ribonucleico

(S) – Estroma

t – translocação

TBE – Tris borato EDTA

TE – Tris EDTA

TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletileno diamina

ter - terminal

TPRG – *protein-tyrosine phosphatase γ gene* (refere-se a gene supressor de tumor)

Tris – hidroxí metil amino metano

U - unidade

VNTR – *variable number of tandem repeat* (número variável de sequência de DNA repetidas em tandem, no intervalo entre 2 sítios de repetição).

μCi – microCurie, Curie= $2,2 \times 10^{12}$ desintegrações por minuto

μg - micrograma

μl - microlitro

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Anatomia da mama e suas lesões em seus sítios anatômicos.....	08
FIGURA 2 - As múltiplas etapas da tumorigênese.....	10
FIGURA 3 - Patogênese do retinoblastoma.....	15
FIGURA 4 - Modelo proposto para atuação do <i>TP53</i> normal e mutado.....	16
FIGURA 5 - Representação do modelo genético para tumores colorretais.....	18
FIGURA 6 - Modelo de evolução do câncer de mama - Frykberg e Bland.....	20
FIGURA 7 - Modelo de progressão do tumor de mama e anomalias genéticas.....	20
FIGURA 8 - Esquema de algumas alterações genéticas encontradas nos cromossomos.....	25
FIGURA 9 – Esquema de 3 ciclos de amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase.....	29
FIGURA 10 – Esquema de microdissecção de tecidos.....	36
FIGURA 11 – Esquema de extração de DNA.....	37
FIGURA 12 – Esquema das etapas de materiais e métodos.....	40
FIGURA 13 – Microdissecção de tecido normal adjacente ao fibroadenoma de mama.	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 14 – Microdissecção de tecido normal adjacente ao fibroadenoma de mama	46
FIGURA 15 – Microdissecção do tecido epitelial do fibroadenoma de mama.	47
FIGURA 16 – Microdissecção do tecido epitelial do fibroadenoma de mama.	48
FIGURA 17 – Microdissecção do tecido estromal do fibroadenoma de mama.	49
FIGURA 18 – Auto-radiograma e densitometrias do caso 13.....	52
FIGURA 19 – Auto-radiograma e densitometrias do caso 49.....	53
FIGURA 20 – Auto-radiograma e densitometrias do caso 52.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Relação de alguns proto-oncogenes identificados, localização celular e função	12
TABELA 2 – Relação de alguns genes supressores de tumor, localização celular e função	14
TABELA 3 – Resumo dos marcadores de microssatélites utilizados para análise de perda de heterozigose.....	39
TABELA 4 - Dados demográficos de 52 pacientes com fibroadenoma de mama.....	42
TABELA 5 – Fatores clínico-cirúrgicos de 52 pacientes com fibroadenoma de mama.....	43
TABELA 6 – Dados referentes ao <i>locus</i> , região cromossômica, casos informativos e perda de heterozigose.....	50
TABELA 7 – Dados clínico-cirúrgicos de 3 pacientes com perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3.....	56

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
SUMMARY	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Fibroadenoma de mama.....	02
1.2. Fatores de risco para o câncer de mama.....	06
1.3. Gênese dos tumores humanos.....	09
1.3.1. Oncogenes.....	11
1.3.2. Genes supressores de tumor.....	13
1.3.3. Genes de reparo de DNA.....	17
1.3.4. Modelo proposto para o carcinoma colorretal.....	17
1.4. Tumorigênese da mama.....	19
1.5. Alterações genéticas em câncer de mama.....	21
1.6. Alterações genéticas em fibroadenoma de mama.....	23
1.7. Análise molecular.....	28

ÍNDICE

	Página
2. OBJETIVO.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Obtenção do material biológico.....	34
3.2. Microdissecção de tecidos.....	35
3.3. Extração de DNA.....	36
3.4. Análise de perda da heterozigose, utilizando marcadores de DNA altamente polimórficos do tipo microsatélites e reação em cadeia da polimerase.....	37
4. RESULTADOS.....	41
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. Fibroadenoma de Mama:

O Fibroadenoma é o tumor benigno de mama mais freqüente em mulheres. Pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais freqüente na faixa etária entre 20 e 30 anos de idade. Aproximadamente 25% das mulheres são portadoras desse tumor, seja ele, sintomático ou não (GEBRIM 1990). Geralmente não causa sintomatologia, sendo o seu achado freqüentemente ocasional. É considerado uma alteração do desenvolvimento da mama, podendo ser classificada como uma aberração do desenvolvimento normal e involução (ANDI) da mama (HUGHES *et al.* 1987; DIXON 1991; HOULIHAN 1991; BARROS e RUIZ 1994; ALLE *et al.* 1996). Em geral, o fibroadenoma é um pequeno nódulo, que costuma ser nitidamente bem delimitado e móvel em relação ao tecido da mama circundante. Este nódulo ocorre habitualmente no quadrante superior externo da mama e cerca de 15% são múltiplos ou bilaterais. O fibroadenoma de mama predomina em mulheres da raça negra. O nódulo fibroadenomatoso tem tamanho variável, podendo, mais raramente atingir forma gigantesca, de até 15 cm de diâmetro, mas a maioria possui entre 2 e 6 cm de diâmetro (FECHNER 1987; GEBRIN 1990; HOULIHAN 1991). O comportamento biológico do fibroadenoma é variável, podendo ocorrer três possibilidades: regressão espontânea (total ou parcial), estabilização de seu tamanho ou seu crescimento. Em estudo clínico realizado por OLIVEIRA 1997, com 44 mulheres de idade inferior a 30 anos com fibroadenomas de mama, verificou-se a regressão de 55,3% dos nódulos de fibroadenoma, aumento do tamanho em 39,3% dos nódulos e sem

INTRODUÇÃO

alteração de tamanho em 5,4% dos fibroadenomas.

Podemos encontrar a denominação de fibroadenoma gigante e fibroadenoma juvenil. O fibroadenoma gigante refere-se a uma massa maior que 8-10 cm de dimensão usualmente encontrada na gravidez e lactação. O fibroadenoma juvenil caracteriza-se por ocorrer em adolescentes. Apresenta um crescimento rápido, na época da puberdade, causando assimetria das mamas e corresponde a 0,5% a 2% dos fibroadenomas. Em ambas as formas, deve-se realizar o diagnóstico diferencial de tumor filóide e fibrossarcoma (FECHNER 1987; HOULIHAN 1991).

A etiologia exata do fibroadenoma de mama é desconhecida, porém alguns estudos sugerem a influência de fatores hormonais no desenvolvimento da unidade ducto lobular terminal. Os lóbulos de mama desenvolvem-se entre os 15 e 25 anos de idade, à partir de estímulos hormonais e são os sítios do fibroadenoma de mama. Este tumor provavelmente desenvolve-se devido a reação anormal ao estímulo hormonal fisiológico. O fibroadenoma possui receptores hormonais para estrogênio e progesterona, e sofre as mesmas modificações que o tecido adjacente, por exemplo, alterações dos níveis durante o ciclo menstrual, alterações na lactação e atrofia pós-menopausa. O receptor de estrogênio está localizado nas células epiteliais (BALAKRISHNAN *et al.* 1987; DENT e CANT 1989; HOUHILAN 1991; BARROS e RUIZ 1994). Contudo, há controvérsias sobre este efeito hormonal. PASQUALINI *et al.* 1997, estudaram os níveis aumentados de estrona, estradiol e seus sulfatos, no tecido de fibroadenomas e os compararam ao tecido normal das pacientes.

INTRODUÇÃO

Observaram não haver diferença significativa, quando comparado aos valores de mulheres saudáveis. Verificaram que o tecido fibroadenomatoso apresentava os sistemas enzimáticos necessários para a biossíntese de estrogênios, sendo que a atividade da enzima sulfatase estava elevada em relação ao tecido normal.

O fibroadenoma de mama é um tumor de crescimento circunscrito, misto, formado por tecido tanto fibroso quanto glandular. É uma lesão pseudo-encapsulada e tende a ser esférica. O padrão histológico é o de um estroma celular e fibroblástico, envolvendo espaços glandulares e císticos revestidos por epitélio. Os fibroblastos estão imersos em abundante material mixóide, rico em mucopolissacarídeos. Em tumores de mais longa evolução e também naqueles, diagnosticados em mulher mais idosa pode apresentar maior quantidade de fibrose, hialinização ou calcificação do estroma (WILKINSON e FORREST 1985; FECHNER 1987; DENT e CANT 1989; BARTH e PRECHTEL 1991; DIXON 1991; HOULIHAN 1991; ALLE *et al.* 1996; STRAUSS 1996; DRUKKER 1997; PAGE e SIMPSON 1998).

O fibroadenoma pode ser simples ou complexo, ou seja, associado a cistos, a calcificações, necrose ou alteração apócrina. Geralmente, o diagnóstico é realizado pelo achado ocasional de nódulo na mama. A dor é incomum. Pode apresentar alteração na inspeção da mama nas formas gigantescas. Na paciente assintomática, geralmente o diagnóstico é realizado após exame clínico ou mamografia rotineira. O fibroadenoma simples apresenta-se na mamografia como uma imagem nodular, de limites precisos, com opacidade pouco maior em relação ao tecido adjacente. Em

INTRODUÇÃO

paciente mais jovem, a elevada densidade radiológica pode ocultar o fibroadenoma, e não permitir distinguir eventuais sinais radiológicos de câncer. A ultra-sonografia é útil na diferenciação de cistos, de outros tumores, avaliações de lesões múltiplas e acompanhamento da evolução do tumor em condutas expectantes. Aparece como uma área nodular fracamente ecogênica, de bordas lisas, e com pouca atenuação acústica. A termografia tem pouco resultado em fibroadenoma. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) quando bem realizada e analisada por profissionais adestrados tem um índice de certeza diagnóstica de fibroadenoma de mais de 90%, excluindo a malignidade e poupando a paciente de cirurgias desnecessárias. Em fibroadenoma, encontramos células agrupadas com núcleos regulares e, algumas vezes, fibroblastos. A *core biopsy* é um procedimento que também pode ser realizada como método diagnóstico tanto nas lesões palpáveis como nas impalpáveis, através de estereotaxia, utilizada principalmente em pacientes jovens com lesões múltiplas. (GEBRIN 1990; BARROS e RUIZ 1994; SKAANE e ENGEDAL 1998; SILVEIRA *et al.* 1999). O principal diagnóstico diferencial deve ser realizado com tumor filóide (nomenclatura atual) ou cistossarcoma filóides (nomenclatura antiga e mais conhecida). Este tumor, que tem 60 denominações diferentes, é também conhecido, por alguns autores, como fibroadenoma hipercelular, devido à grande celularidade de seu estroma. Ocorre em mulheres numa faixa etária de 40-45 anos, podendo também acometer mulheres jovens. Porém, ao contrário do fibroadenoma simples, o tumor filóides apresenta um crescimento rápido, grande dimensão, recidiva

INTRODUÇÃO

freqüente e possui evolução diversa com possível invasão local (WILKINSON e FORREST 1985; DENT e CANT 1989; CARTER 1990; GEBRIM 1990; BARROS e RUIZ 1994; GEBRIM *et al.* 2000).

1.2. Fatores de Risco para Câncer de Mama:

Estudos epidemiológicos indicaram que pacientes com fibroadenoma de mama, apresentam um risco aumentado em desenvolver câncer de mama. (MOSKOWITZ *et al.* 1980; ROBERTS *et al.* 1984; DUPONT *et al.* 1985, 1993, 1994; CARTER *et al.* 1988; KRIEGER *et al.* 1992; MCDIVITT *et al.* 1992; LEVI *et al.* 1994; OZISIK *et al.* 1994). DUPONT *et al.* 1994, analisaram 1835 casos de pacientes com fibroadenomas, comparando-os com pacientes que nunca apresentaram lesões. Demonstraram que nas pacientes com fibroadenoma o risco relativo para desenvolver câncer de mama invasivo foi 2,17 vezes maior. Este risco relativo eleva-se para 3,10 vezes em pacientes com fibroadenomas complexos e em casos de doença proliferativa ou história familiar de câncer de mama, este risco relativo eleva-se para 3,88 e 3,72, respectivamente. Outros estudos, como os de ROBERTS *et al.* 1984; MCDIVITT *et al.* 1992; ROSENBERG *et al.* 1997, verificaram que lesões benignas associadas a fatores como hiperplasia e atipia, constituem risco relativo aumentado em desenvolver uma neoplasia.

KUROSUMI *et al.* 1994, constataram a coexistência da proliferação *in situ* e das lesões invasivas com fibroadenoma. Estes autores observaram também que

INTRODUÇÃO

muitas mulheres que desenvolveram carcinoma *in situ* (*CIS*) de mama, numa faixa etária em torno dos 44 anos, apresentaram fibroadenoma de mama em um período mais jovem de sua vida.

A análise de fatores clinicopatológicos de 105 pacientes com carcinoma, desenvolvendo-se com fibroadenomas foi realizada por DIAZ *et al.* 1991. Estes autores observaram que houve 95% de crescimento de *CIS* , e uma frequência de ocorrência semelhante nos tipos lobular e ductal. *CIS*, dentro de fibroadenoma, está associado com doença maligna *in situ* no tecido de mama adjacente em aproximadamente 21% dos casos, e acompanhado de alta porcentagem de carcinomas invasivos resultando de fibroadenomas. Outros estudos epidemiológicos demonstraram haver risco relativo para transformação maligna em doenças benignas, quando correlacionados com hiperplasia ou atipia, como os estudos de METTLIN 1992; BODIAN *et al.* 1993, ou doença fibrocística (HUTCHINSON *et al.* 1980; HENDERSON *et al.* 1993; TOBIAS *et al.* 1999).

FITZGIBBONS *et al.* 1998, relataram o consenso promovido pelo Comitê de Câncer do Colégio Americano de Patologistas, demonstrando não haver risco para fibroadenomas simples, apenas para os fibroadenomas complexos (um risco de 1,7 a 2,1). LONDON *et al.* 1992, observaram um aumento de risco relativo para o câncer de mama em doenças não proliferativas sem atipias.

A seguir, na figura 1, mostramos o fibroadenoma de mama em seu sítio anatômico e algumas lesões de mama.

INTRODUÇÃO

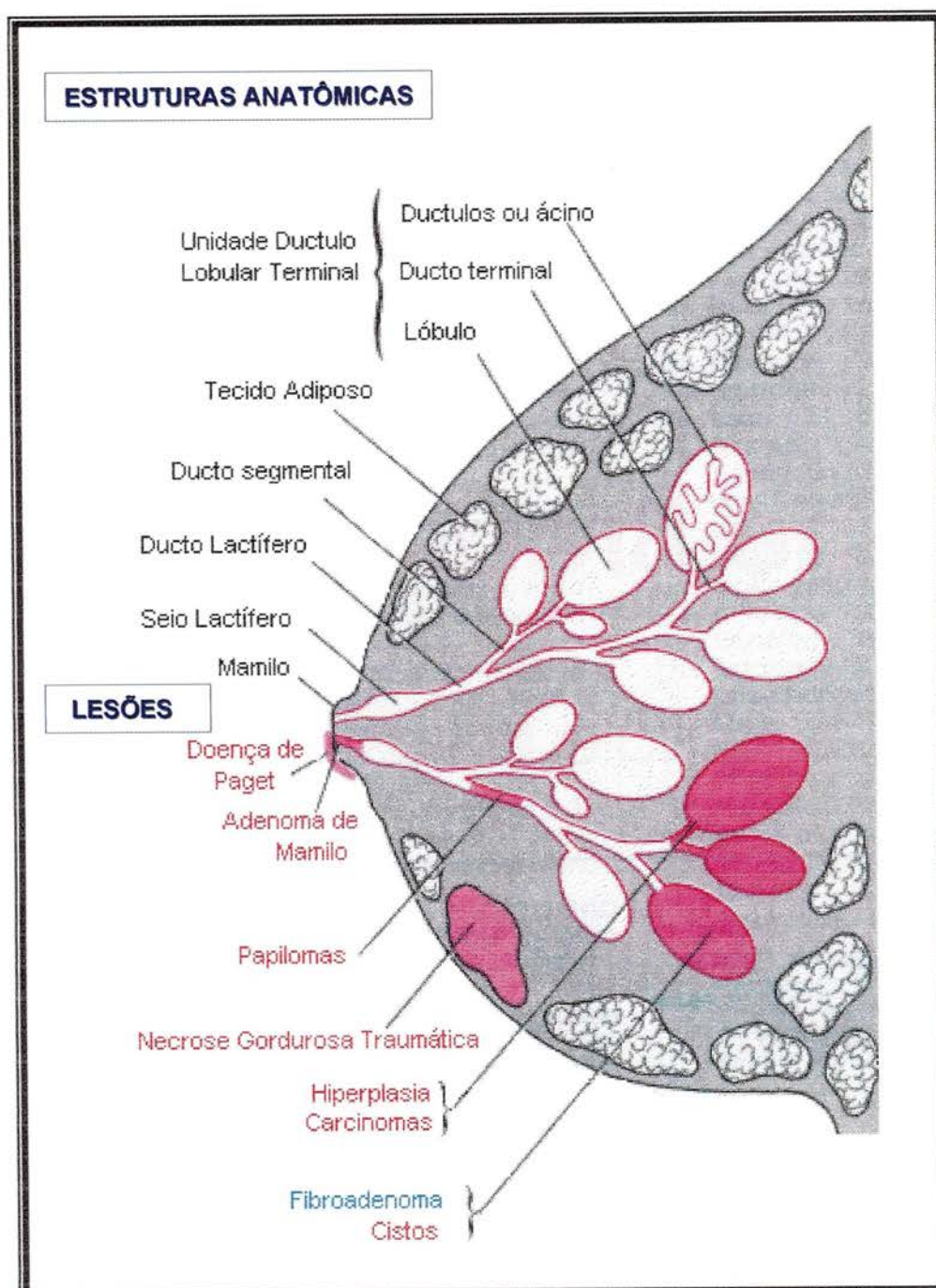


Figura 1 - Anatomia da mama e suas lesões em seus sítios anatômicos
(Modificado de COTRAN *et al.* 1994)

INTRODUÇÃO

As alterações moleculares destes tumores são pouco conhecidas. A maioria dos trabalhos realizados são estudos citogenéticos.

1.3. Gênese dos Tumores Humanos:

O câncer é uma doença essencialmente genética. A gênese dos tumores malignos depende do acúmulo de alterações genéticas, que ocorrem mais freqüentemente nas células somáticas, podendo ocorrer nas células de origem germinativa. A gênese tumoral é um processo complexo, advindo da desregulação do controle de proliferação celular. É multifatorial e de múltiplas etapas onde ocorrem o acúmulo de alterações genéticas, proliferação celular aberrante e expansão clonal. Fatores exógenos (agentes químicos, radiações e viroses) e endógenos (genéticos e epigenéticos), atuam de maneira cumulativa nas múltiplas etapas da tumorigênese, ou seja, no processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna (NAGAI *et al.* 1995; CHO e HEDRICK 1997, HANAHAHAN e WEINBERG 2000). A fase de iniciação tumoral depende da ação de fatores carcinogénéticos ou indutores. Estes fatores atuam pelo menos sobre uma única célula, fazendo com que haja um dano no DNA nuclear, promovendo uma alteração no ciclo celular, e gerando um clone celular modificado. A célula sofrerá mutação, modificando a sua carga genética e transmitindo-a às células-filhas. As células modificadas reproduzem-se, podendo sofrer influência de fatores promotores ou inibidores. As alterações genéticas necessitam dos agentes promotores para o desenvolvimento do tumor, que

INTRODUÇÃO

é um processo lento (fase de promoção). Nesta etapa de promoção ocorre a proliferação sem alterar o DNA. A seguir, ocorre a fase de progressão, onde as células se desenvolvem e formam, então, o tumor inicial. Nesta fase ocorre a conversão da hiperplasia ou tumor benigno em maligno, e a metastatização. Ocorrem novas alterações genéticas, que se acumulam durante o processo (NAGAI *et al.* 1995; BARROS e PINOTTI 1998). Figura 2.

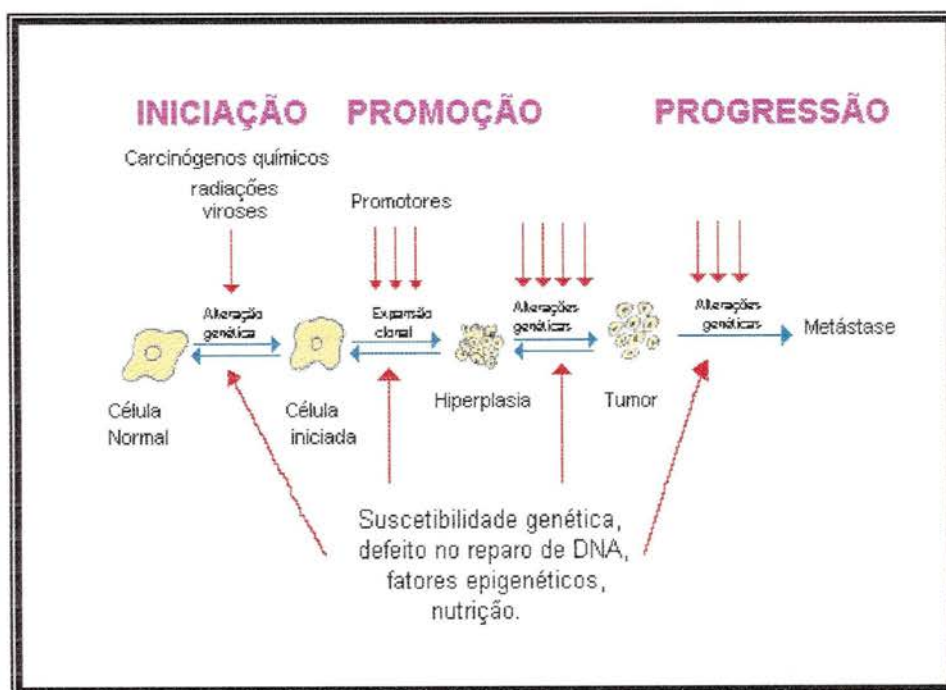


Figura - 2 - As múltiplas etapas da tumorigênese: Iniciação, Promoção e Progressão. (Modificado de NAGAI *et al.* 1995).

INTRODUÇÃO

Demonstrou-se neste processo tumorigênico a importância de três classes de genes celulares específicos: oncogenes, genes supressores de tumor e os genes de reparo de DNA.

1.3.1. Oncogenes:

Os proto-oncogenes são considerados genes normais, que codificam proteínas envolvidas com a regulação da multiplicação celular normal. Estes genes celulares, quando alterados, apresentam um ganho de função, ou seja, podem através de um evento mutacional promover a tumorigênese, sendo, então, denominados de oncogenes. O proto-oncogene é convertido de um gene celular normal para um oncogene por alguns mecanismos, que incluem: mutação de ponto, amplificação gênica, translocação cromossômica e rearranjo estrutural. A ativação de apenas um dos alelos do gene é suficiente para determinar a alteração protéica codificada e iniciar a multiplicação celular (MORRISON *et al.* 1994; NAGAI *et al.* 1995; CHO e HEDRICK 1997).

As proteínas codificadas por proto-oncogenes podem ser classificadas em categorias como: fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, proteínas moduladoras e fatores de transcrição, conforme podemos observar na tabela 1.

INTRODUÇÃO

TABELA 1 - Relação de alguns proto-oncogenes identificados, localização celular e função:

Gene	Localização	Função
<i>Sis</i>	Extracelular	Homólogo à cadeia β do PDGF
<i>Int-2</i>	Extracelular	Relacionado à família do FGF
<i>Hst</i>	Extracelular	Relacionado à família do FGF
<i>Src</i>	Membrana Plasmática	Tirosina quinase
<i>Yes</i>	Membrana Plasmática	Tirosina quinase
<i>Abl</i>	Membrana Plasmática	Tirosina quinase
<i>Erb-B</i>	Transmembrana	Homólogo ao receptor de EGF truncado
<i>Fms</i>	Transmembrana	Homólogo ao receptor de CSF-1
<i>Met</i>	Transmembrana	Homólogo ao receptor de HGF
<i>Ha-ras</i>	Membrana Plasmática	Relacionado às proteínas G. Atividade GTPásica
<i>Ki-ras</i>	Membrana Plasmática	Relacionado às proteínas G. Atividade GTPásica
<i>N-ras</i>	Membrana Plasmática	Relacionado às proteínas G. Atividade GTPásica
<i>Raf/mil</i>	Citoplasma	Serina quinase
<i>Mos</i>	Citoplasma	Serina quinase
<i>Myc</i>	Núcleo	Replicação de DNA e ativação de transcrição
<i>N-myc</i>	Núcleo	Replicação de DNA e ativação de transcrição
<i>L-myc</i>	Núcleo	Replicação de DNA e ativação de transcrição
<i>Myb</i>	Núcleo	Replicação de DNA e ativação de transcrição
<i>Fos</i>	Núcleo	Associado ao jun forma o fator de transcrição AP1
<i>Jun</i>	Núcleo	Associado ao jun/ fos forma o fator de transcrição AP1
<i>Erb-A</i>	Núcleo	Homólogo ao receptor de T3

Fonte: NAGAI *et al.* 1995

INTRODUÇÃO

1.3.2. Genes Supressores de Tumor:

Assim como os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor são genes celulares normais, que de forma contrária aos oncogenes, participam impedindo a multiplicação celular. Dessa forma, participam do processo tumorigênico quando inativado, perdendo a habilidade de regular a proliferação celular. Mutações neste gene geralmente resulta em perda de função. O modelo clássico de genes supressores de tumor foi postulado por Knudson 1971, para o retinoblastoma, uma doença da infância que envolve um tumor de retina. O retinoblastoma ocorre quando as duas cópias do gene *Rb* (localizados na região 13q14) são inativadas. Na forma hereditária, o primeiro evento mutacional é de ocorrência germinativa, sendo transmitida a todas as células do indivíduo, e o segundo evento de ocorrência somática. Na forma esporádica, há necessidade de dois eventos mutacionais de origem somática para desencadear a doença (KNUDSON 1971, 1993; SOLOMON *et al.* 1991; NAGAI *et al.* 1995; LEWIN 1997).

O comportamento dos genes supressores de tumor é recessivo, há necessidade da inativação dos dois alelos para a ocorrência do tumor. Uma série de mecanismos mutacionais podem ocorrer. O mais frequente é a perda de heterozigose (LOH), que acontece como consequência de deleções intersticiais, perdas cromossômicas ou eventos de recombinação mitótica aberrante; e é um fator comum em muitos tipos de tumores. Em uma região afetada correspondente num cromossomo homólogo pode-se encontrar um provável gene supressor de tumor.

INTRODUÇÃO

A perda ou inativação de *loci* cromossômicos específicos têm sido correlacionada à progressão do tumor em muitas neoplasias (CALLAHAN *et al.* 1992; NAGAI *et al.* 1995). A seguir mostramos, na tabela 2, alguns genes supressores de tumor e suas localizações subcelulares e funções.

TABELA 2 – Relação de alguns genes supressores de tumor, localização subcelulares e função dos produtos codificados por estes genes:

Gene	Localização subcelular	Função
<i>TP53</i>	Núcleo	Fator de transcrição
<i>Rb1</i>	Núcleo	Fator de transcrição
<i>APC</i>	Citoplasma	Ligação a β catenina
<i>NF1</i>	Citoplasma	Proteinase GTPase ativadora
<i>NF2</i>	Citoesqueleto com a membrana	Integração do citoesqueleto
<i>BRCA1</i>	Núcleo (?)	Fator de transcrição, sistema de reparo, outras (?)
<i>BRCA2</i>	Desconhecida	Fator de transcrição, sistema de reparo, outras (?)
<i>WT1</i>	Núcleo	Fator de Transcrição
<i>DCC</i>	Membrana Plasmática	Molécula de adesão celular
<i>MTS1</i>	Núcleo	Inibidor de quinase
<i>p16</i>	Núcleo	Inibidor de quinase ciclina- dependente

Verificamos adiante, na figura 3, um esquema do modelo clássico do retinoblastoma, proposto por Knudson 1971.

INTRODUÇÃO

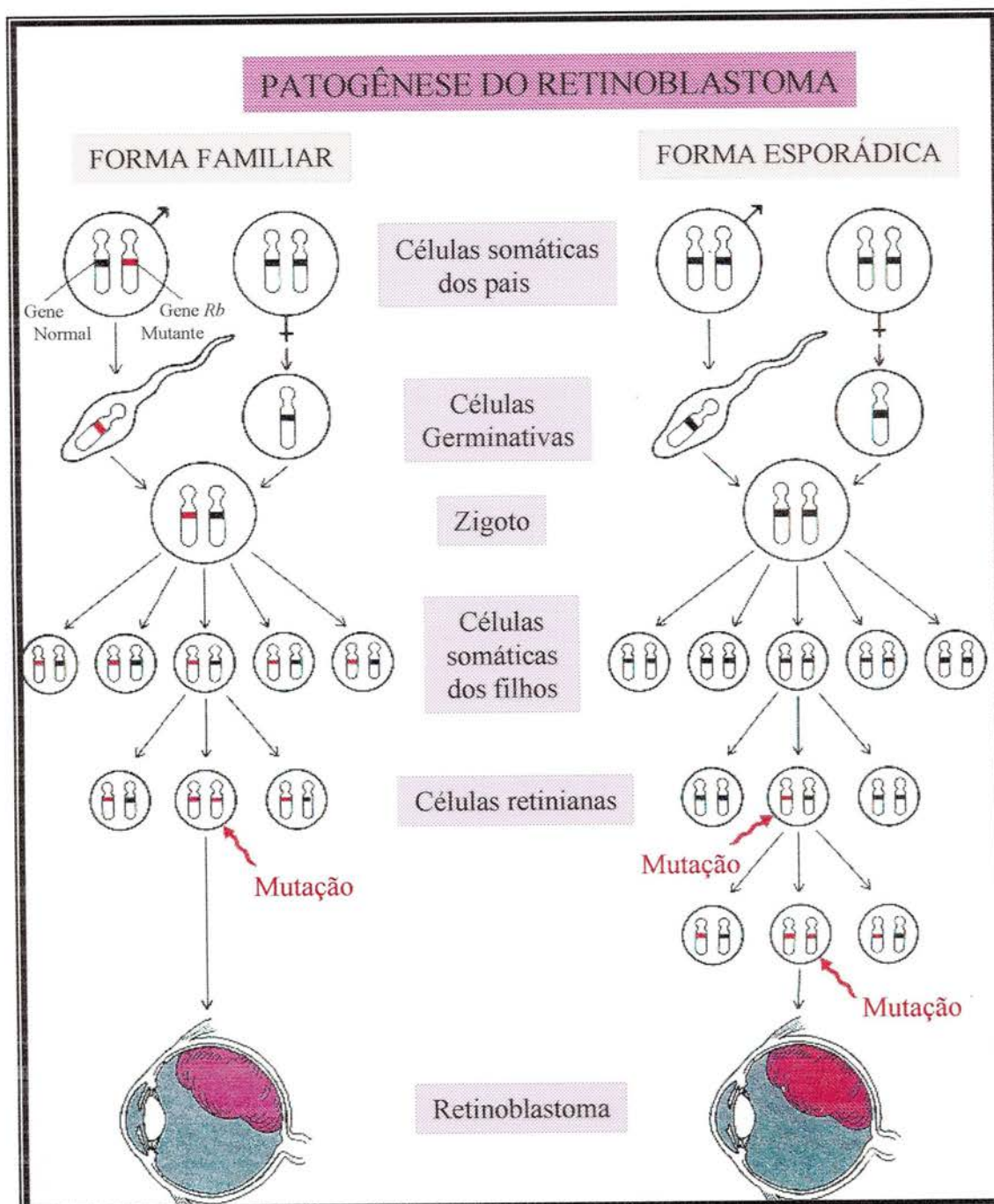


Figura 3 - Patogênese do retinoblastoma. São necessários dois eventos mutacionais no *locus* do gene *Rb* do cromossomo 13q14, para a proliferação neoplásica das células retinianas. (Modificado de COTRAN *et al.* 1994)

INTRODUÇÃO

O gene supressor mais freqüentemente mutado nos tumores humanos é o *TP53*, que é denominado o "guardião do Genoma". A proteína codificada por este gene foi nomeada pelo seu peso molecular de 53 Kda. Esta fosfoproteína nuclear regula a replicação do DNA, proliferação e morte celular. O mecanismo de atuação preciso do *TP53* como gene supressor de tumor ainda é desconhecido, porém, sabe-se que atua prevenindo a propagação de danos celulares. A proteína p53 mantém a integridade genômica. Se ocorre lesão do DNA, a p53 se acumula e bloqueia a replicação, dando oportunidade ao DNA para ser reparado. Se o reparo do DNA não se completar a p53 dispara o processo de apoptose. Em células em que a proteína p53 está inativa, esta não apresentará atividade bloqueadora na replicação, ocorrendo acúmulos de mutações e rearranjos cromossômicos (MAY P e MAY E 1999).

Figura 4.

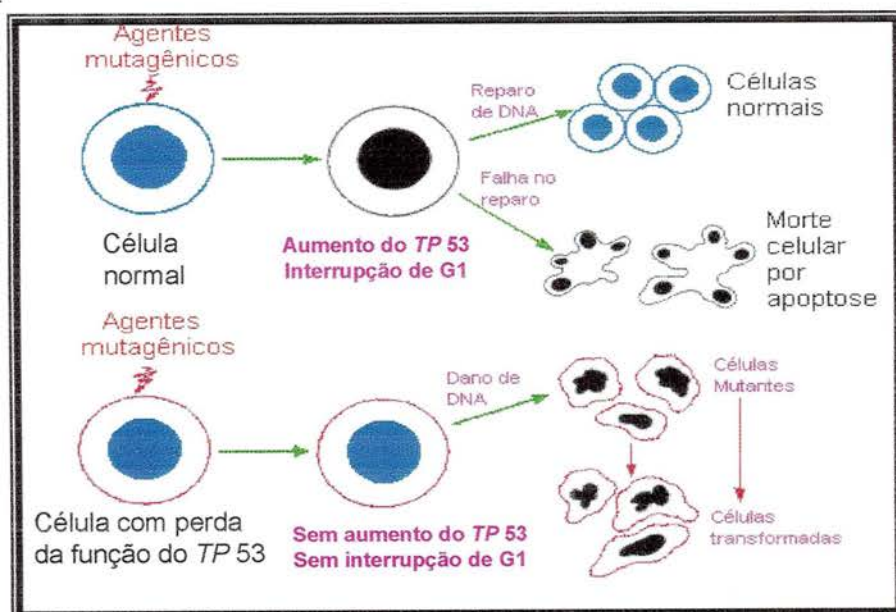


Figura 4 - Modelo proposto para a atuação do *TP53* normal e mutado. (Modificado de COTRAN *et al.* 1994).

INTRODUÇÃO

1.3.3. Genes de Reparo de DNA:

Os genes de reparo de DNA são genes que codificam proteínas envolvidas no reconhecimento e reparo do DNA. Assim como os genes supressores de tumor, a inativação destes genes, ou seja, a perda de função, está relacionada à tumorigênese. Provavelmente, a inativação destes genes favorece um aumento na taxa de mutação em oncogenes e genes supressores de tumor, nas células afetadas. Em alguns tumores e em linhagem germinativa de indivíduos com predisposição ao câncer, foram encontradas mutações nos genes de reparo de DNA. Quando o sistema de reparo de DNA está comprometido, a taxa de acúmulos de mutações se eleva.

Genes responsáveis pelo reparo de DNA, conhecidos como *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* e *hMSH6*, apresentam perda de função em HNPCC (câncer colorretal hereditário não polipóide) (LAGE e DIETEL 1999; PINHO e ROSSI 1999). Evidências existem, de que 15% dos carcinomas colorretais esporádicos são formados a partir de alterações dos genes de reparo de DNA. (PINHO e ROSSI 1999).

1.3.4. Modelo proposto para o carcinoma colorretal:

Para o desenvolvimento tumoral é necessário o acúmulo de uma série de alterações genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor. A maioria dos tumores sólidos dos adultos apresentam várias mutações. Um modelo proposto por FEARON e VOGELSTEIN 1990, para o câncer colorretal, demonstrou a relação da

INTRODUÇÃO

tumorigênese com eventos genéticos (mutação no gene *APC*, alterações de metilação e mutações nos genes *K-ras*, *DCC* e *TP53*), observando as etapas da progressão do epitélio normal para o metastático. Figura 5 .

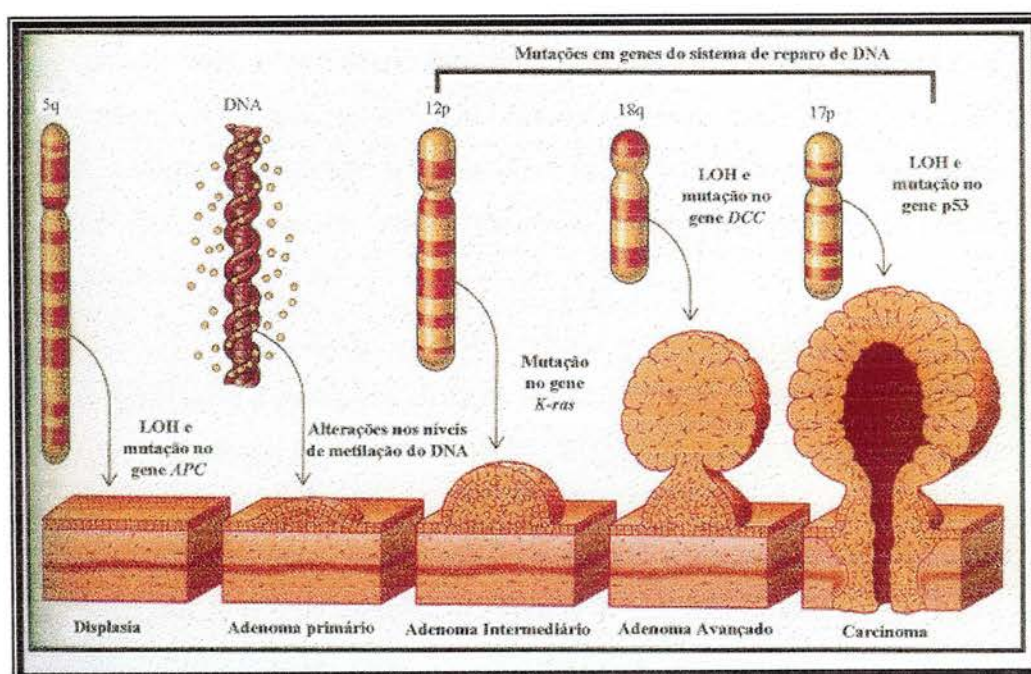


Figura 5 - Representação do modelo genético, proposto por FEARON e VOGELSTEIN para a tumorigênese colorretal. (Adaptado de WEINBERG e HANAHAN, 1996).

INTRODUÇÃO

1.4. Tumorigênese da Mama:

Alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama foram descritas, a fim de estabelecer uma seqüência de estágios para o processo de tumorigênese em carcinomas de mama. Teoricamente, o caminho da tumorigênese inicia-se no tecido normal, passa por várias etapas intermediárias como hiperplasias típica e atípica, sofrendo influências de fatores estimulantes e inibidores até chegar a carcinoma invasor e metástase. Na prática, porém, a comprovação dessas etapas progressivas teóricas são difíceis de serem obtidas. Em alguns casos, encontramos todas estas etapas precursoras, mas na maioria isto não ocorre. Alguns modelos para tumorigênese foram descritos, como o de FRYKBERG e BLAND e o de BIÈCHE e LIDEREAU 1995. Este último, mais conhecido, apresenta, além das etapas evolutivas, as alterações genéticas encontradas no desenvolvimento do tumor de mama, como: perda de heterozigose, amplificação gênica e desregulação de hormônios e fatores de crescimento. Modelos propostos para a progressão do tumor de mama estão ilustrados nas figuras 6 e 7.

INTRODUÇÃO

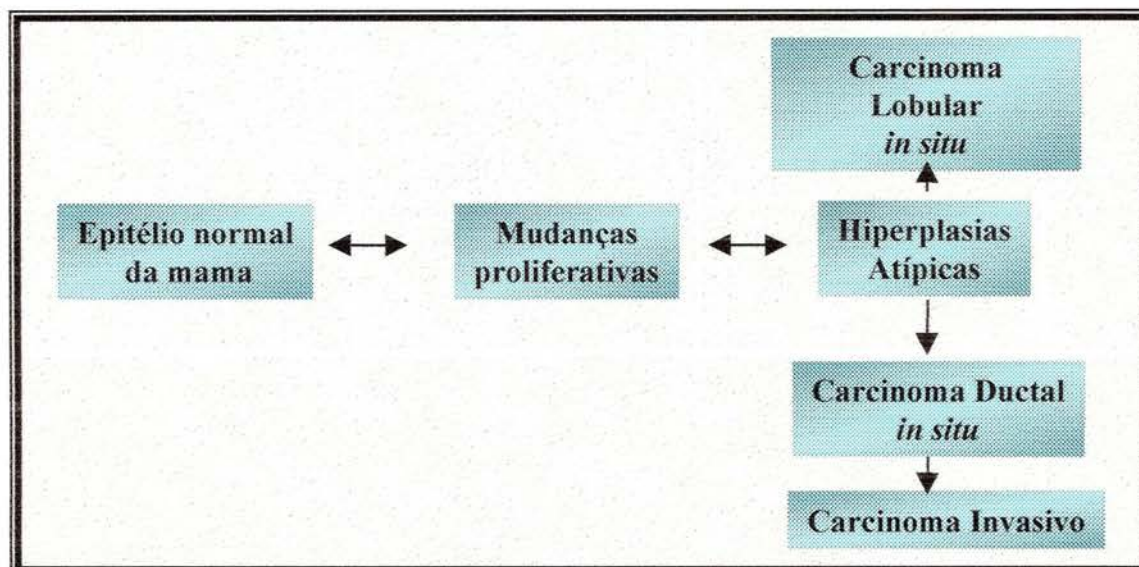


Figura 6 - Modelo de evolução do câncer de mama, modificado de FRYKBERG e BLAND. Este modelo, inclui lesões que não necessariamente são precursores do tumor maligno. Alguns estágios podem ser reversíveis. (Modificado de LUNDIN e Mertins 1998).

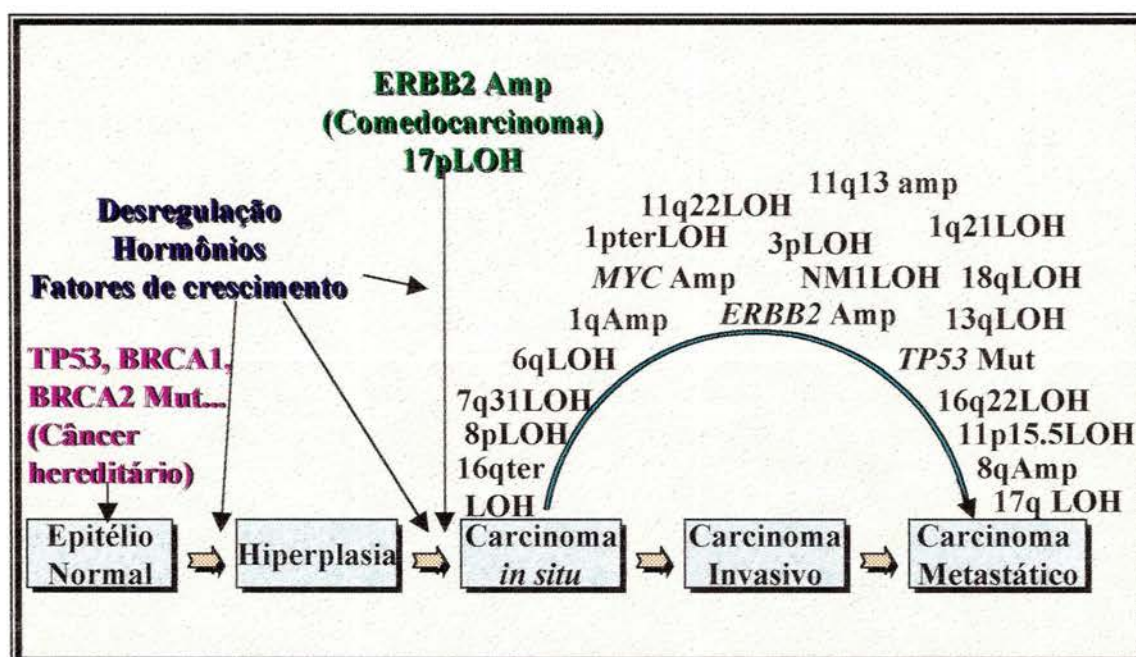


Figura 7 - Modelo de progressão do tumor de Mama e Anomalias Genéticas. (BIÈCHE e LIDEREAU 1995).

INTRODUÇÃO

1.5. Alterações Genéticas em Câncer de Mama:

Estudos têm sido realizados para determinar quais os eventos genéticos, e com que frequência, ocorrem no câncer de mama na sua forma esporádica e familiar (HALL *et al.* 1990; MALKIN *et al.* 1990; BUCHHAGEN *et al.* 1994; LALLE *et al.* 1994; BIÈCHE e LIDEREAU 1995; COLLINS *et al.* 1995; SCHMUTZLER *et al.* 1996). Estes estudos sugerem uma variedade de alterações genéticas, envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor no desenvolvimento do câncer de mama. A amplificação gênica tem mostrado um papel importante na patogênese e prognóstico de vários tumores sólidos, incluindo o câncer de mama. O aumento de expressão dos proto-oncogenes *c-erbB-2*, *c-int-2* e *c-myc* tem sido associado a um pior prognóstico e maior recorrência em câncer de mama (CALLAHAN *et al.* 1992; NAGAI *et al.* 1993; ODAGIRI *et al.* 1994; BIÈCHE e LIDEREAU 1995). Técnicas moleculares aprimoraram-se para detectar, diretamente, várias alterações cromossômicas. Estudos demonstraram a alta perda de heterozigose (LOH) sobre as regiões cromossômicas 1p, 1q, 3p, 6q, 11p, 13q, 17p, 17q e 18q, mutações em genes supressores já clonados como o *TP53* e o *Rb1*, e alteração na expressão do gene antimetástase *nm23*, associados à gênese do tumor de mama (LEONE *et al.* 1991; BIÈCHE e LIDEREAU 1995). Os genes supressores de tumor *BRCA 1*, *BRCA2*, *TP53* e *ATM* estão associados à susceptibilidade ao câncer de mama familiar (MALKIN *et al.* 1990; COLLINS *et al.* 1995; KLEIHUES *et al.* 1997; CORVELLO 1999).

INTRODUÇÃO

Dentre os estudos moleculares realizados em câncer de mama para a região cromossômica 3p destacam-se:

SATO *et al.* 1991, realizaram um estudo molecular para perda de heterozigose, com análise de 219 carcinomas de mama, para as regiões cromossômicas 3p, 16q e 17q, por RFLP (análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição). Estes pesquisadores observaram perda de heterozigose de 46,7% para o braço curto do cromossomo 3 (56/120) e entre 12 *loci* estudados para esta região, foi observada, uma maior frequência de alterações na região D3S659 (23 de 54, correspondendo à 42,6%).

CHEN *et al.* 1994, relataram perda de heterozigose em 2 regiões distintas no braço curto do cromossomo 3, estudando 108 carcinomas de mama. Encontraram 2 regiões separadas, 3p13-14 e 3p24-26 (41% e 32% de LOH respectivamente), usando RFLP e FISH.

Métodos de estudos utilizando microdissecção de tecidos e investigação utilizando marcadores polimórficos do tipo microssatélite pela reação em cadeia da polimerase, estão sendo utilizados na análise cromossômica em câncer de mama; porém, até o momento, poucos estudos foram realizados com o objetivo de determinar especificamente, quais os eventos genéticos que estão associados ao desenvolvimento do fibroadenoma.

INTRODUÇÃO

1.6. Alterações Genéticas em Fibroadenoma (FA):

Grande parte das pesquisas realizadas em FA provêm de estudos citogenéticos. Alguns destes estudos apresentam alterações cariotípicas clonais associadas aos fibroadenomas. As anormalidades genéticas encontradas envolvem alterações numéricas e estruturais em cromossomos específicos (STEPHENSON *et al.* 1992; OZISIK *et al.* 1994; ROHEN *et al.* 1996; STAATS *et al.* 1996; PETERSSON *et al.* 1997). Uma variedade de alterações cromossômicas podem estar envolvidas no desenvolvimento de fibroadenomas, como rearranjos envolvendo as regiões cromossômicas 1q, 3p, 4q, 5q, 8q, 9, 11, 12, 14q, e 16q, ganho dos cromossomos 5, 6, 7, 11 e 17 e deleções das regiões cromossômicas 1, 3p, 6q e 7. LEUSCHNER *et al.* 1994, relataram um caso de fibroadenoma recorrente em uma mulher de 25 anos, demonstrando um caso típico de anormalidade clonal. Estes autores verificaram translocação (6;14), cromossomo em anel, e dois marcadores envolvendo parte do cromossomo 11. OZISIK *et al.* 1994, analisaram citogeneticamente 25 fibroadenomas, e observaram 3 casos de alterações cromossômicas clonais, envolvendo os cromossomos 1, 2, 8, 12 e 16. No estudo citogenético de 30 fibroadenomas realizado por ROHEN *et al.* 1996, foram encontrados 3 casos que apresentaram anormalidades cromossômicas clonais, dois possuindo alterações estruturais e um apresentando trissomia do cromossomo 5. 46, XX, der (6) t (1;6) (q25; p21.3); 48,XX, del (6) (q21),r (11) (?), der (14) t (6;14)(q21;q32),+2mar; e 47,XX,+5.

INTRODUÇÃO

DIETRICH *et al.* 1995, evidenciaram translocação em 2 de 15 casos de fibroadenomas de mama. STEPHENSON *et al.* 1992, realizaram estudos citogenéticos e hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e detectaram em 3 dos 7 pacientes com alterações genéticas, a translocação entre os cromossomos 3 e 5; um caso apresentando trissomia do cromossomo 8; e o último possuía dois clones, um que continha um cromossomo 11 a mais em 15% das células, e o outro um cromossomo 10 excedente em 2,4% das células. A trissomia do cromossomo 11 encontrada estava confinada às células de origem mesenquimal, enquanto que a trissomia do cromossomo 10, detectada no mesmo tumor pode ter sido originada por um componente epitelial. A presença de um clone com adição de um cromossomo 11, restrita às células mesenquimais, já havia sido observada anteriormente. BELDA *et al.* 1993, relataram um rearranjo cromossômico clonal, t(4;14)(q24-25;q24.3) em um fibroadenoma de mama.

A maior parte dos estudos revelou uma porcentagem dominante de fibroadenomas sem anormalidades citogenéticas. No entanto, aberrações recorrentes foram detectadas. As alterações cromossômicas clonais relatadas, numéricas e estruturais, envolvem principalmente os cromossomos 1, 3, 4, 6, 11 e 12.

A figura 8 apresenta um esquema de algumas alterações genéticas encontradas nos cromossomos.

INTRODUÇÃO

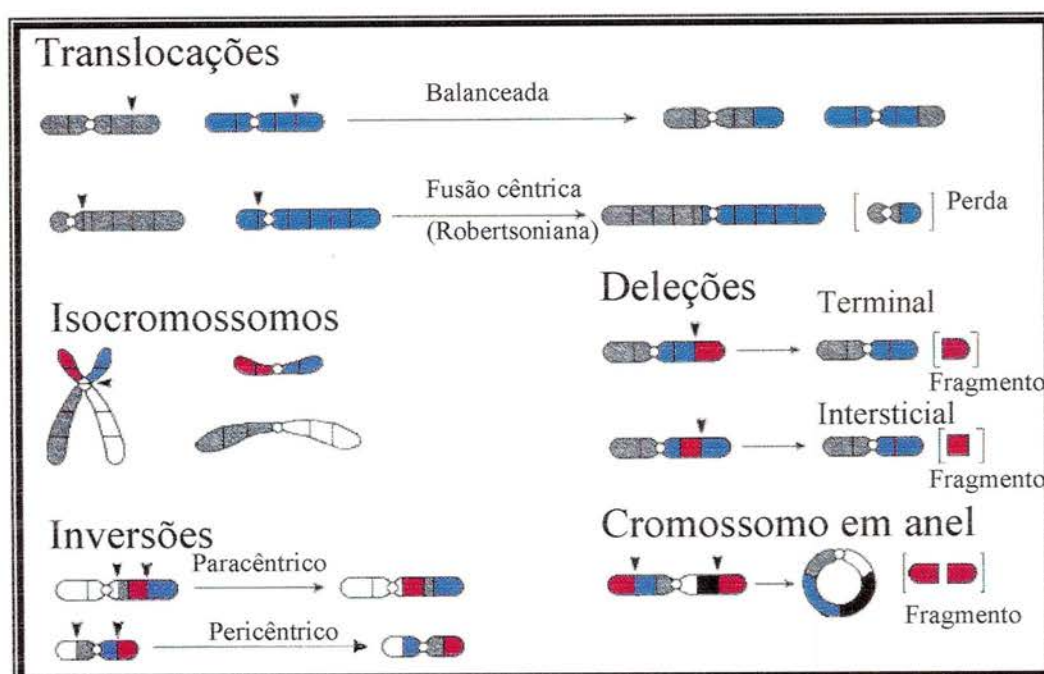


Figura 8 - Alguns tipos de alterações estruturais de cromossomos (Modificado de Cotran *et al.* 1994).

Alguns poucos autores têm procurado investigar a ocorrência de alterações genéticas em fibroadenomas utilizando técnicas de biologia molecular. Nos estudos de LALLE *et al.* 1994, foram detectados 2 casos de perda da heterozigose (LOH) em fibroadenomas, em um contexto familiar, utilizando marcadores polimórficos do tipo microssatélite, mapeados na região cromossômica 17q, perto do *locus BRCA 1*. As perdas de heterozigose observadas são pequenas perdas intersticiais, sendo este o

INTRODUÇÃO

primeiro relato de perda da heterozigose em lesões benignas de mama, realizado em um contexto de predisposição hereditária. Outros estudos citogenéticos e moleculares têm procurado investigar se as alterações genéticas encontradas em carcinoma de mama também estão presentes em fibroadenoma (ODAGIRI *et al.* 1994; NOGUCHI *et al.* 1993,1995; DIETRICH, *et al.* 1995; MCCULLOCH *et al.* 1998).

A expressão do oncogene *c-myc* e a de mais três genes da família *ras* (*c-H-ras*, *c-K-ras* e *c-N-ras*) foi examinada por WHITTAKER *et al.* 1986, em 4 fibroadenomas, sendo que apenas um dos casos analisados mostrou expressão do oncogene *c-N-ras*.

Estudos analisando a expressão do oncogene *c-erbB-2* e do gene supressor de tumor *TP53* têm sido realizados com anticorpos monoclonais, comparando dados encontrados nos fibroadenomas com os presentes em câncer de mama e correlacionando a expressão do *c-erbB-2* e *TP53* com a atividade proliferativa e o índice prognóstico. WHITTAKER *et al.* 1986; ODAGIRI *et al.* 1994, não encontraram expressão do *c-erbB-2* e do gene supressor de tumor *TP53*, nestes tumores benignos. Além disso, estudos realizados por RÓS 1998, demonstrou o aumento de expressão dos genes *IGF-2* e *H19* nos fibroadenomas de mama, sendo em 61,9% o aumento simultâneo destes 2 genes.

A falha dos estudos moleculares em detectar alterações genéticas em fibroadenomas pode ser devida a policlonalidade dessas lesões.

INTRODUÇÃO

Os fibroadenomas são tumores policlonais, compostos de células epiteliais e estromais. Entretanto, existe na literatura evidência da ocorrência de alterações genéticas clonais nestes tumores (FLETCHER *et al.* 1991; ROHEN *et al.* 1996; KASAMI *et al.* 1998). Estudos de NOGUCHI *et al.* 1993, avaliaram 10 casos de fibroadenomas e 5 casos de tumores filóides através da reação em cadeia da polimerase. Estes autores evidenciaram a origem de células policlonais, tanto para as células epiteliais, quanto para as estromais. Os casos de tumores filóides apresentaram células epiteliais de origem policlonal e células estromais de origem clonal. Sendo assim, consideraram ser o fibroadenoma mais uma hiperplasia do lóbulo do que uma neoplasia, e o tumor filóide demonstrou ser um neoplasma de células estromais, mas não de células epiteliais. ROHEN *et al.* 1996; STAATS *et al.* 1996; ROSENBERG *et al.* 1997, também consideraram as alterações cariotípicas clonais das lesões benignas de mama. A análise clonal é um método eficaz na distinção de neoplasia e hiperplasia. Vários tipos de tumores humanos benignos e malignos têm mostrado origem monoclonal. Por outro lado, a expansão policlonal é esperada em hiperplasia (FLETCHER *et al.* 1991). Embora o fibroadenoma seja classificado como um tumor benigno de mama na maioria das pesquisas, NOGUCHI *et al.* 1993, sugeriram que ele é um estágio hiperplásico ou o desenvolvimento anormal do lóbulo, que antecede a neoplasia. Sendo o fibroadenoma um tumor bifásico, ainda não se sabe, se é o componente epitelial ou o estromal que representa a origem do tumor.

INTRODUÇÃO

1.7. Análise Molecular:

O avanço significativo das técnicas de biologia molecular tem modificado, ao longo dos anos, o conhecimento referente aos genes. O advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), proposto por SAIKI *et al.* 1985, permitiu um desenvolvimento importante, principalmente pela oportunidade de análise de pequena quantidade de material, ou seja, DNA ou RNA. A técnica baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de 2 oligonucleotídeos ("primers"), que hibridizam as fitas complementares de uma sequência molde ("template"). As extremidades 3' dos primers são orientadas apontando uma em direção à outra. Vários ciclos são repetidos com variações de temperatura, que permitem a desnaturação do DNA molde, hibridização dos primers às suas sequências complementares e extensão dos primers hibridizados pela DNA polimerase. Ao final de múltiplos ciclos, há o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos primers (INNIS *et al.* 1990; NAGAI, 1998). A figura 9 apresenta esquematicamente 3 ciclos de amplificação da reação em cadeia da polimerase.

INTRODUÇÃO

Reação em Cadeia da Polimerase

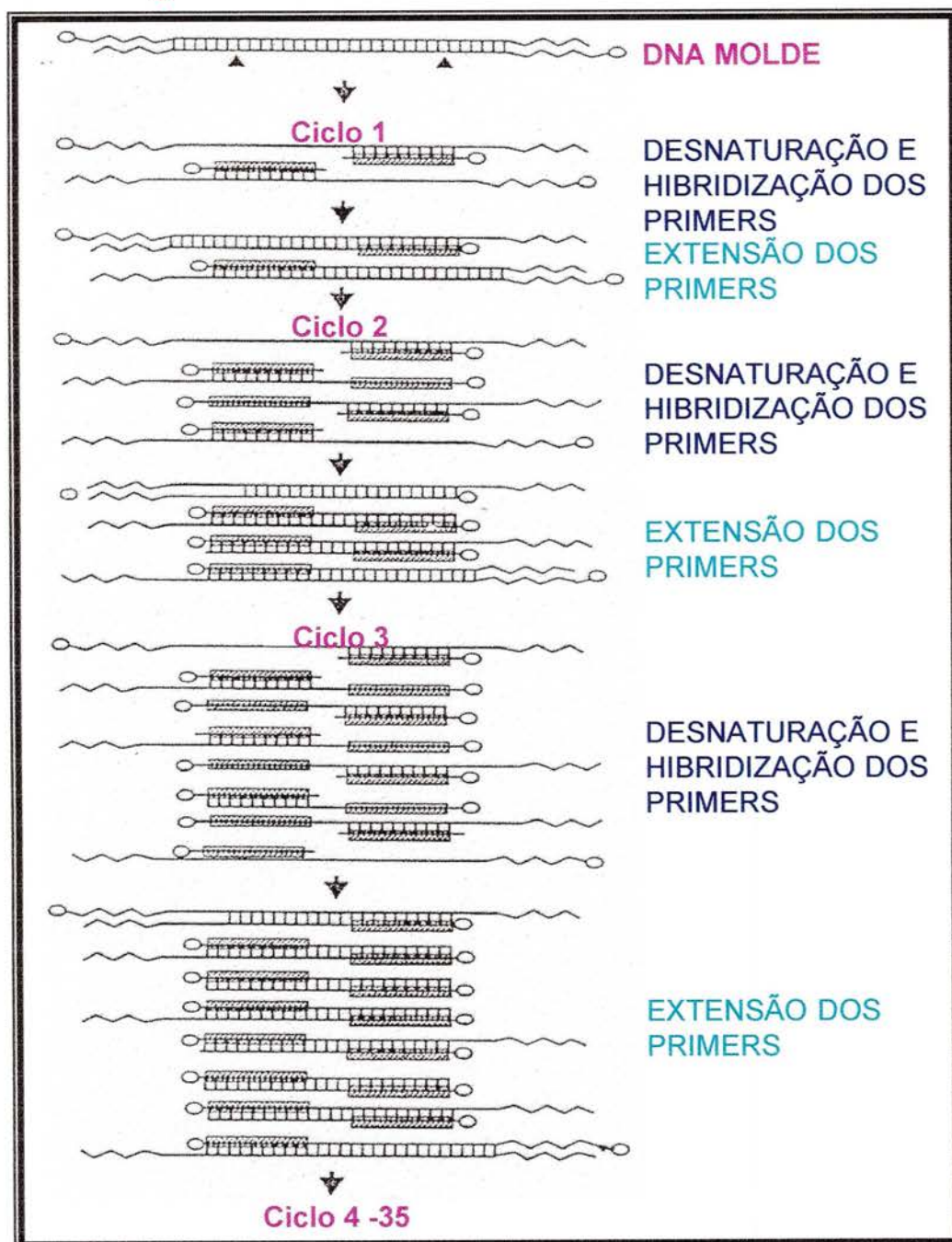


Figura 9 - Esquema de 3 ciclos de amplificação da reação em cadeia da polimerase - PCR (Modificado de Nagai 1998).

INTRODUÇÃO

Um importante fato foi a utilização dos marcadores de DNA altamente polimórficos do tipo microssatélite. Estes marcadores pertencem a família dos satélites, ou seja, das seqüências repetitivas de DNA não codificadas, dispersas no genoma humano. Podemos encontrar o DNA repetitivo sob a forma de seqüências repetidas aleatórias (tandem), ou DNA satélite, e as repetições intercaladas. As seqüências satélites são repetições curtas e são divididas em: microssatélites, minissatélites e macrossatélites. Microssatélites são pequenos polimorfismos de DNA, freqüentemente com menos de 1 Kb de tamanho. As repetições dinucleotídeas (AC)_n são as mais conhecidas. Seu número pode variar de 10 à 60. Minissatélites são repetições onde a seqüência principal é maior que a encontrada nos microssatélites. As macrossatélites podem ser muito grandes, com até megabases de tamanho. (BRUFORD e WAYNE 1993; KORETH *et al.* 1996, REMER 1999).

As atuais técnicas de análise moleculares permitem um estudo mais acurado do genoma, contribuindo para a elucidação da gênese dos tumores. O entendimento dos eventos genéticos envolvidos no desenvolvimento de fibroadenomas, pode permitir a identificação dos eventos iniciais associados ao processo de transformação maligna da mama. Portanto, novos estudos, utilizando microdissecção de tecidos e técnicas moleculares, são necessários para a determinação das alterações genéticas, que contribuem para o desenvolvimento dessas lesões benignas.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a identificação de alterações genéticas em fibroadenomas de mama, através da técnica de microdissecção de tecidos e a análise da perda da heterozigose, utilizando marcadores de DNA altamente polimórficos do tipo microssatélite.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do Material Biológico :

Foram analisadas amostras de tumor e tecido normal de pacientes com fibroadenoma de mama, obtidas através de procedimento cirúrgico, no Hospital Pérola Byington (Centro de Referência da Saúde da Mulher, e de Nutrição, Alimentação e Desenvolvimento Infantil - CRSMNADI), sob a responsabilidade do médico mastologista Dr. Carlos Alberto Ruiz. As amostras foram coletadas no período de outubro de 1998 a janeiro de 1999. Os espécimes cirúrgicos, sem qualquer outro tratamento prévio, foram encaminhados imediatamente ao serviço de patologia do Hospital Pérola Byington (CRSMNADI), onde foram realizados cortes de 5 µm, sendo as lâminas fixadas, e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina para diagnóstico (LUNA 1972; HOROBIN 1982). Após confirmação histopatológica, sob a coordenação da Dra. Regina Felippo Barboza, as amostras foram reanalisadas. Tumores filóides, fibroadenomas que apresentavam calcificações e/ou outras alterações associadas, foram excluídos. Eliminou-se, também, áreas com necrose, hemorragia e com componente inflamatório, para que não comprometesse o estudo.

Confirmado o diagnóstico de fibroadenoma simples, o tumor foi encaminhado para este estudo. Confeccionou-se uma lâmina corada pela técnica da Hematoxilina- Eosina, com lamínula, para estudo prévio e 2 lâminas coradas, somente pela Eosina, sem lamínula, utilizadas para microdissecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.2. Microdissecção de Tecidos:

As lâminas foram encaminhadas ao laboratório de Genética Molecular de Câncer da disciplina de Oncologia do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde foi procedida a microdissecção. A microdissecção foi realizada sob visualização microscópica utilizando-se microscópio binocular (OLYMPUS BHC) com quatro objetivas, segundo técnica demonstrada, em estudos de CHUAQUI *et al.* 1996; NAYAR *et al.* 1997. Utilizamos a objetiva 4 (menor) com um aumento global de 40x, para melhor visualização. Em alguns casos, em que a identificação de partes dos componentes tornou-se difícil, utilizamos a objetiva 3 com um aumento global 100x. Demarcamos visualmente as áreas de interesse seguindo uma ordem (tecido Normal, tecido Epitelial e tecido Estromal) em virtude da quantidade de tecido e dificuldade de dissecção da lâmina. Dissecamos, separamos e retiramos fragmentos de tecido com uma agulha estéril 25 x 7 gauge. Para a dissecção de cada amostra houve necessidade de troca de todo material (luva cirúrgica de látex e agulha) para evitar contaminação de uma amostra e seus componentes para outra.

Após a microdissecção, o material foi colocado em 3 tubos separados e identificados de microcentrífuga com rosca, de 1,6 ml e encaminhados à extração de DNA.

A Figura 10 apresenta um esquema da microdissecção de tecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

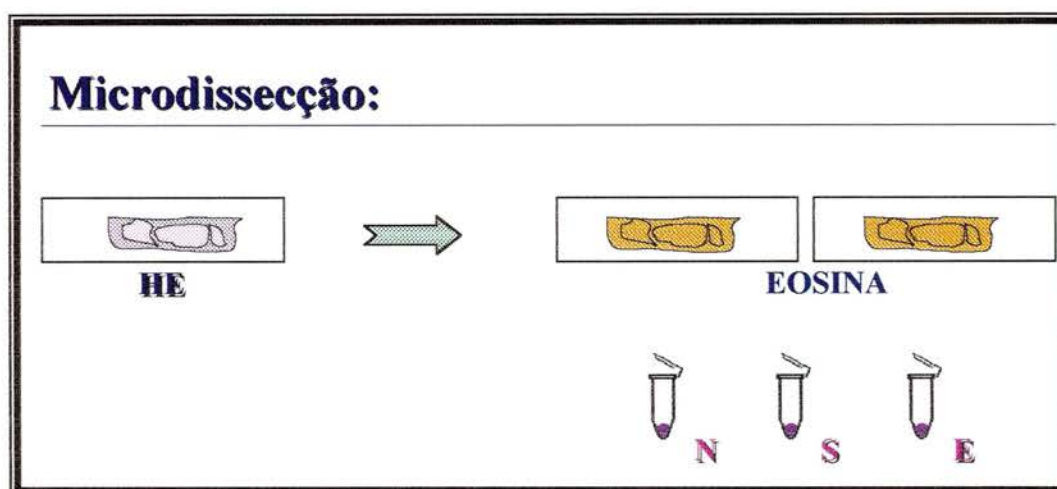


Figura 10 - Representação esquemática da fase de microdissecção de tecidos.

3.3. Extração de DNA: (SAMBROOK *et al.* 1989; NAGAI 1998)

Os fragmentos dos tecidos microdissecados foram utilizados para extração do DNA. O material obtido por microdissecção foi imediatamente colocado em 50 μ L de solução tampão contendo 0,05 mol/L de Tris-HCL, 0,001 mol/L de EDTA, 1% Tween 20, 0,5 μ l de Proteinase K a 20 mg/ml, pH 8,0 e incubados à 55 °C por 12 horas e fervido por 10 minutos para inativar a Proteinase K. A seguir, foi colocado no gelo por 10 minutos. Para cada amostra, 1 à 3 μ l de solução foi usada para PCR.

A figura 11 mostra um esquema da extração de DNA em material microdissecado.

MATERIAIS E MÉTODOS

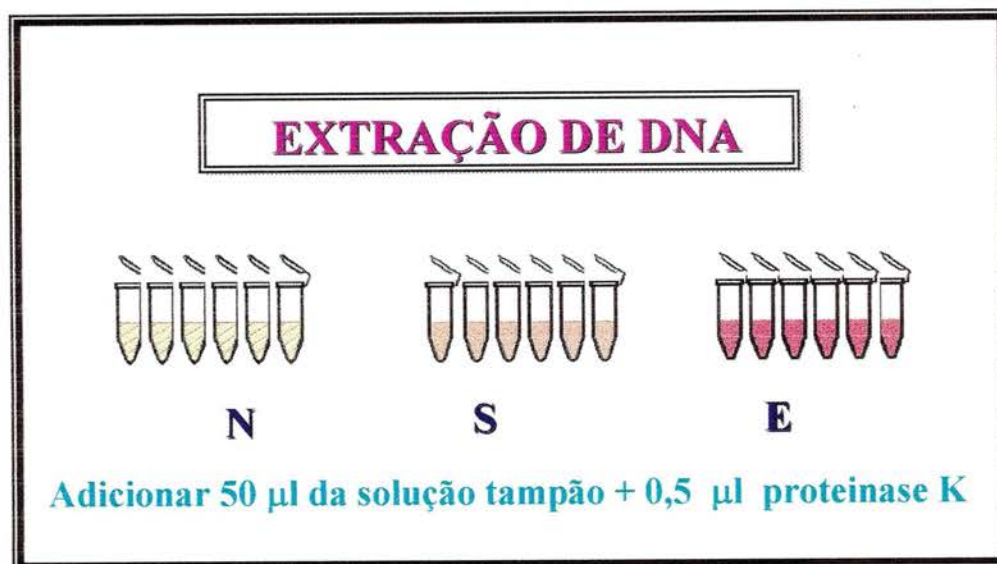


Figura 11- Representação esquemática da extração de DNA.

3.4. Análise de Perda da Heterozigose (LOH), Utilizando Marcadores de DNA Altamente Polimórfico do Tipo Microsatélites e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): (SAMBROOK *et al.* 1989; NAGAI 1998)

Nesta análise utilizamos os marcadores de DNA altamente polimórficos do tipo microsatélite. As reações de PCR foram feitas em um volume de 25 µl, utilizando 50 ng de DNA genômico, 50 pmol de cada oligonucleotídeos, 1,5 mM de MgCL₂, 200 µm de cada desoxinucleotídeo trifosfatado, 50 mM de KCL, 10 mM de Tris-HCL pH 8,3, 0,1 mg/ml de gelatina, 0,75 mg de BSA, 0,5 unidades de *TaqDNA* polimerase (GIBCOBRL) e 50 pmol de um dos oligonucleotídeos marcados com

MATERIAIS E MÉTODOS

0,1 μ Ci α 32 P - dCTP. A amplificação foi feita por 30 ciclos, cada ciclo constituído por 1 minuto à 94 °C, 1 minuto na temperatura de hibridização adequada para cada jogo de primers e 1 a 2 minutos à 72 °C. Os produtos obtidos foram diluídos 1:2 em tampão de aplicação (formamida 90%, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,35% e Xileno cianol 0,35%), fervidos por 5 minutos e separados em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (Uréia 8M, solução acrilamida/bisacrilamina 6%, TBE 1X) com tampão TBE 1X (Tris-HCL 0,09, Ácido Bórico 0,09M e EDTA 0,2mM). A corrida eletroforética foi realizada a 2000 volts, 250 watts, 120 mA por 2 horas à uma temperatura de 50 °C. Após a corrida o gel foi transferido, para papel cromatográfico Whatmann 3MM Chr, submetido ao processo de secagem em secador termo-vácuo mod.583 (Biorad), por 30 minutos e exposto a filme de raio X KODAK X-Omat XAR por 4-48 horas a -70 °C, sendo posteriormente revelado e realizada a análise do auto-radiograma. Quando necessário, fez-se re-exposição do gel por período de até 7 dias, dependendo da intensidade obtida no auto-radiograma.

Para análise das perdas de heterozigose foram utilizados marcadores de microssatélite para as regiões cromossômicas D3S659 (3p13), D6S249 (6q16.3-q21), D10S219, D10S541, D10S574, D10S1735, D10S1765 (10q21-22), D11S860 (11p15), W40 (11p13), TP53 (17p13.1) e 248yg (17q), demonstrados na tabela 3.

MATERIAIS E MÉTODOS

TABELA 3 - Resumo dos marcadores de microssatélites utilizados para análise de perda de heterozigose (LOH).

Marcador	Sequência	Produto(bp)
CI-373	CTGCAAGGTCTGTTTAACAG ATTCCAGGGACAAGTTCCCC	~113
249	TTCTATTTCTGAAGGTGAACTA ATAGTTACCATCAGTCACTG	146-164
219	TCTTTCTACCACCCCCC GCAGAGAACCTAAAGCATCC	89-103
541	AAGCAAGTGAAGTCTTAGAACCACC CCACAAGTCACAGAAAGCCTGTCTC	247-273
574	GTCGGACTCTGTGATTGTG TGCTTAATGGGGACAGG	124-135
1735	CCTGATTTGGATGCCATGT TGACTCAGTGGGGCCTAGA	173-177
1765	CACTTACATAGTGCTTTCTGCG CAGCCTCCCAAAGTTGC	166-184
860	GCAACACGTACACACTGAGACA TAGTATTTTGCCATAGAAGAAGC	154-196
W40	AATGAGACTTACTGGGTGAGG TTACACAGTAATTTCAAGCAACGG	140-148
439	GATAGTGCTATCCTCTTGCA GTTACACCGGTTCTGCAGAT	160-188
LH1/LH2	AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC	~100
248yg9	GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG ACACAGACTTGTCCTACTGCC	143-155

Referências: HAUGE *et al.* 1992, JONES *et al.* 1992a, JONES e NAKAMURA 1992b; TADOKORO *et al.* 1993; WINQVIST *et al.* 1993, SHENG *et al.* 1996, FEILLOTTER *et al.* 1998; YOKOSAKI *et al.* 1999.

MATERIAIS E MÉTODOS

A determinação de perda de heterozigose, ou desequilíbrio genético, foi feita pela comparação entre o sinal autoradiográfico de DNA Tumoral, nas amostras de Estroma e do Epitélio (Genótipo Tumoral), em relação ao sinal observado, na amostra de DNA do tecido normal (Genótipo Constitutivo). As perdas totais foram determinadas pela simples comparação visual, enquanto que as perdas parciais foram quantificadas utilizando-se um densitômetro Pharmacia LKB - Ultrosan XL. Foram considerados positivos os casos em que o padrão de alelos de tumor apresentavam pelo menos 40% de diminuição de intensidade, em uma das bandas no autoradiograma. A figura 12 mostra um esquema das etapas de materiais e métodos.

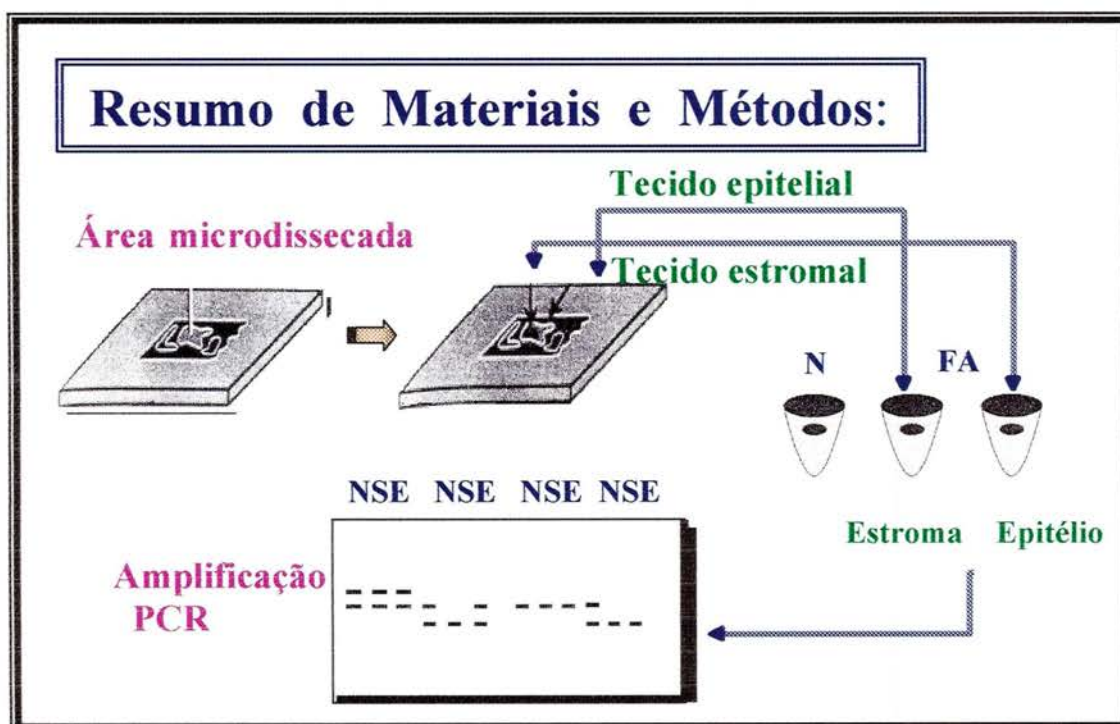


Figura 12 - Representação esquemática dos procedimentos realizados neste trabalho. Resumo de Materiais e Métodos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

RESULTADOS

Foram analisados, no laboratório de Genética Molecular de Câncer da disciplina de Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 52 Fibroadenomas de Mama simples, provenientes de procedimentos cirúrgicos realizados no Hospital Pérola Byington (CRSMNADI).

A média de idade das pacientes submetidas a procedimento cirúrgico por Fibroadenoma de Mama foi de 30 anos, variando de 17 a 51 anos, com uma mediana de 28 anos. Tabela 4.

TABELA 4 - Dados demográficos de 52 pacientes com Fibroadenoma de Mama:

Variável	Categoria	Frequência	(%)
Raça	Branca	23	(44,2)
	Não Branca	16	(30,8)
	Ignorado	13	(25,0)
Idade	Média $\pm$ dp	30,0 $\pm$ 10,7	
Fumo	Não	38	(73,0)
	Sim	12	(23,0)
	Ignorado	2	(4,0)

Fonte: Arquivo do Hospital Pérola Byington (CRSMNADI) - 2000

Nesta amostragem, predominaram as mulheres com nódulo único de mama (78,9%), sendo a maioria das lesões tumorais localizada na mama esquerda (24 casos). A média de tamanho dos tumores analisados foi de 2,9 cm (1,5 - 6,5 cm). Os dados referentes às variáveis clínico-cirúrgicas estão presentes na tabela 5.

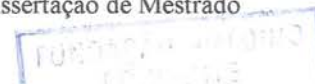
RESULTADOS

TABELA 5 - Fatores clínico-cirúrgicos de 52 pacientes com Fibroadenoma de

Mama:

Fatores	Categoria	Frequência	(%)
Nº Nódulos	Múltiplos	11	(21,5)
	Único	41	(78,9)
Localização	Mama Direita	20	(38,4)
	Mama Esquerda	24	(46,2)
	Bilateral	08	(15,4)
Gestação	G=0	24	(46,2)
	G≥1	27	(51,9)
	Ignorado	01	(1,9)
Clínica	Nódulo de mama	14	(27,0)
	Nódulo mama + Outras	32	(61,5)
	Outras	06	(11,5)
Cirurgia Prévia de Mama	Doença benigna	08	(15,4)
	Doença maligna	-	-
	Sem cirurgia	43	(82,7)
	Ignorado	01	(1,9)
História familiar	Câncer de mama	03	(5,8)
	Outros Canceres	08	(15,3)
	Outras doenças benignas	15	(28,9)
	Ignorado	02	(3,9)
	Sem história familiar	24	(46,1)
Lactação	Sim	19	(36,5)
	Não	28	(53,9)
	Ignorado	05	(9,6)
Tamanho do nódulo	Média	2,9cm (1,5 - 6,5cm)	
Contraceptivo Oral	Sim	08	(15,4)
	Não	39	(75,0)
	Ignorado	05	(9,6)
Uso Medicamentos	Hormonal	-	-
	Não hormonal	07	(13,5)
	Ignorado	02	(3,8)
	Não usa	40	(82,7)
Menarca	Média	13,2 anos (9-17a.)	

Fonte: Arquivo do Hospital Pérola Byington (CRSMNADI) – 2000.



RESULTADOS

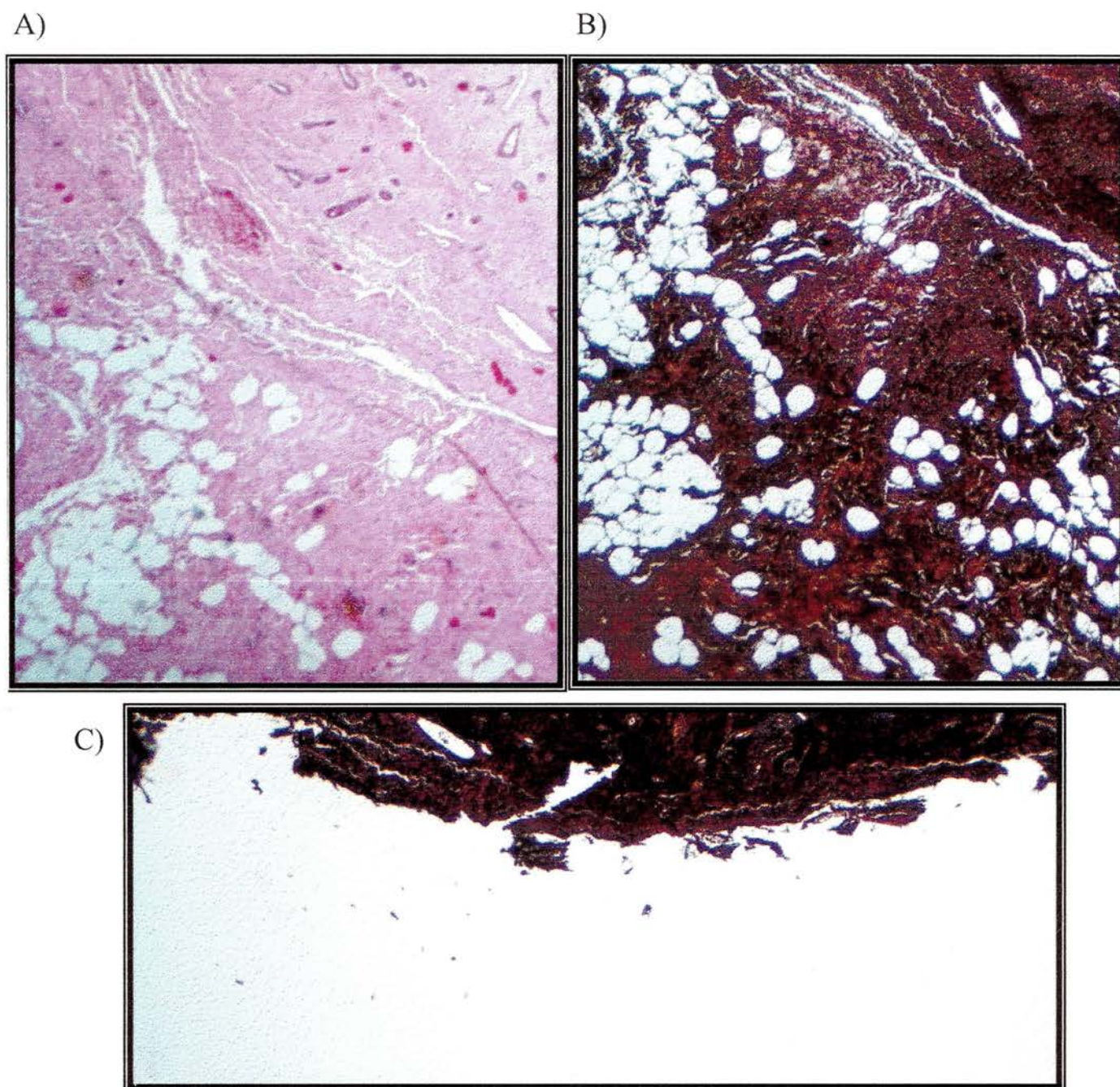


Figura 13 - Microdissecção do tecido normal adjacente ao fibroadenoma de mama.

A) Análise prévia com lâmina corada com Hematoxilina-Eosina (HE) 40x.

B) Antes da microdissecção - lâmina corada com Eosina.

C) Após a microdissecção - lâmina corada com Eosina - 40x.

RESULTADOS

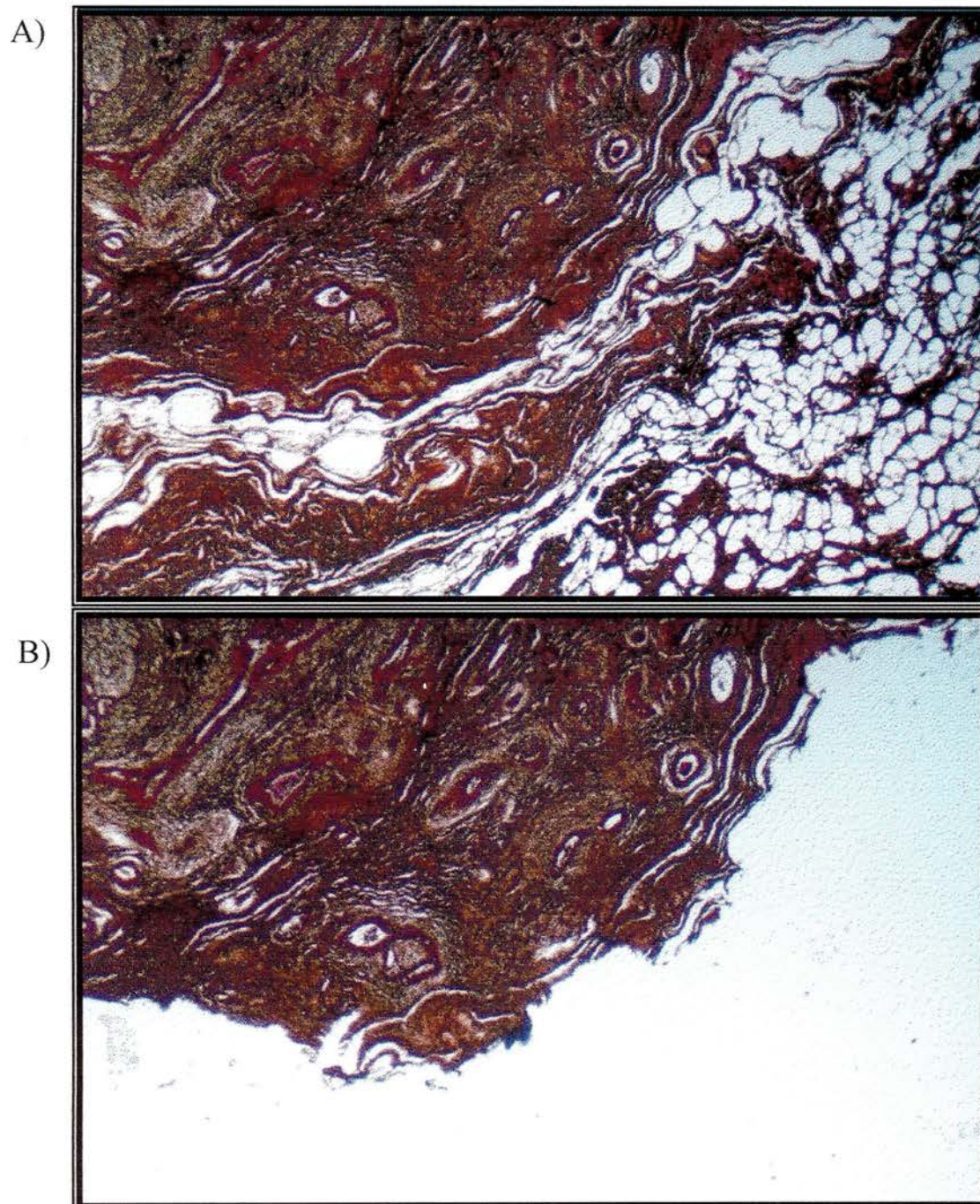


Figura 14 - Microdissecção do tecido normal adjacente ao fibroadenoma.

A) Antes da microdissecção. B) Depois da microdissecção.

Lâminas coradas com Eosina - 40x.

RESULTADOS

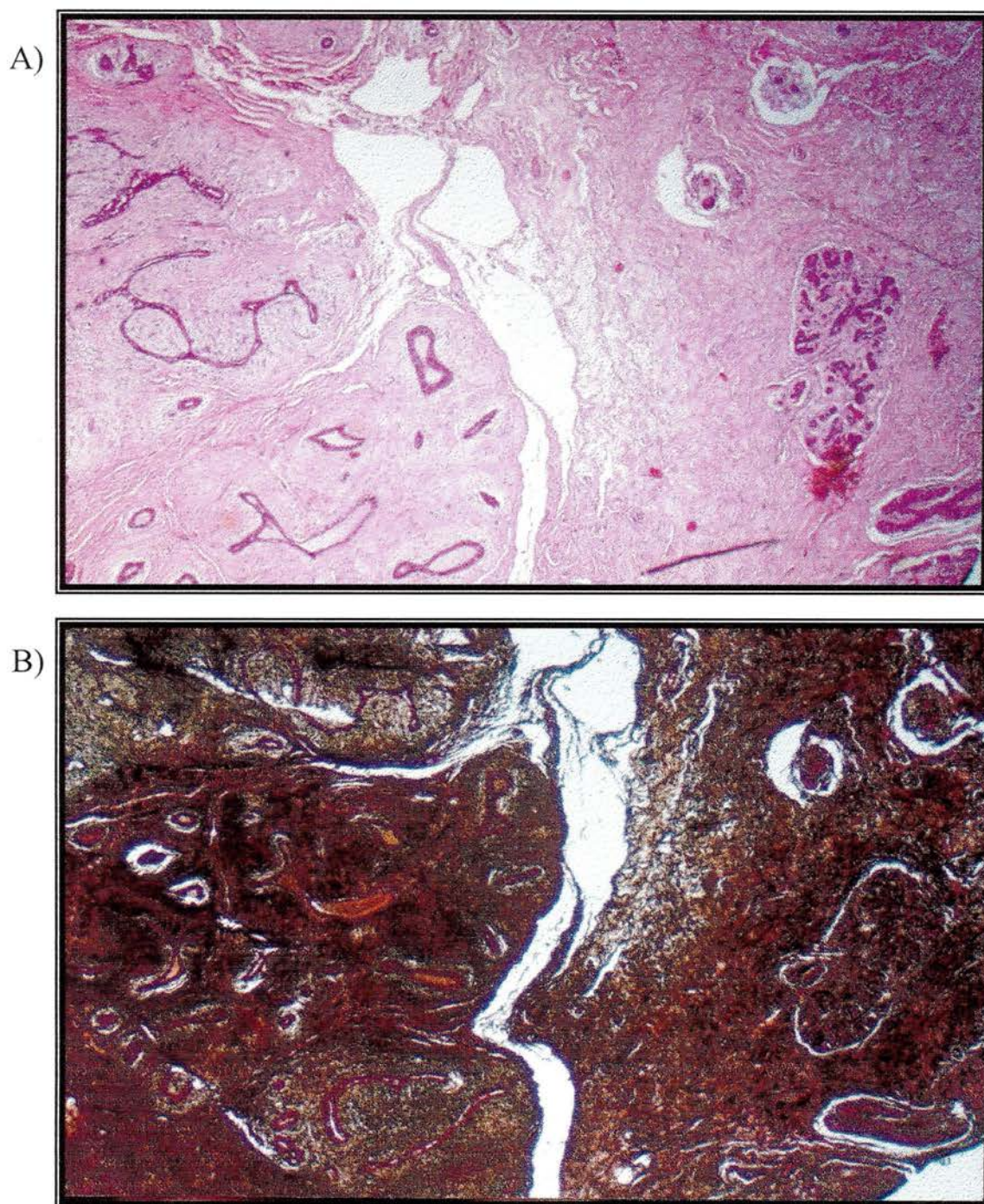


Figura 15 - Microdissecção do tecido epitelial do fibroadenoma de mama.

A) Análise prévia com lâmina corada com Hematoxilina-Eosina (HE) - 40x.

B) Análise em lâmina corada com Eosina - 40x.

RESULTADOS

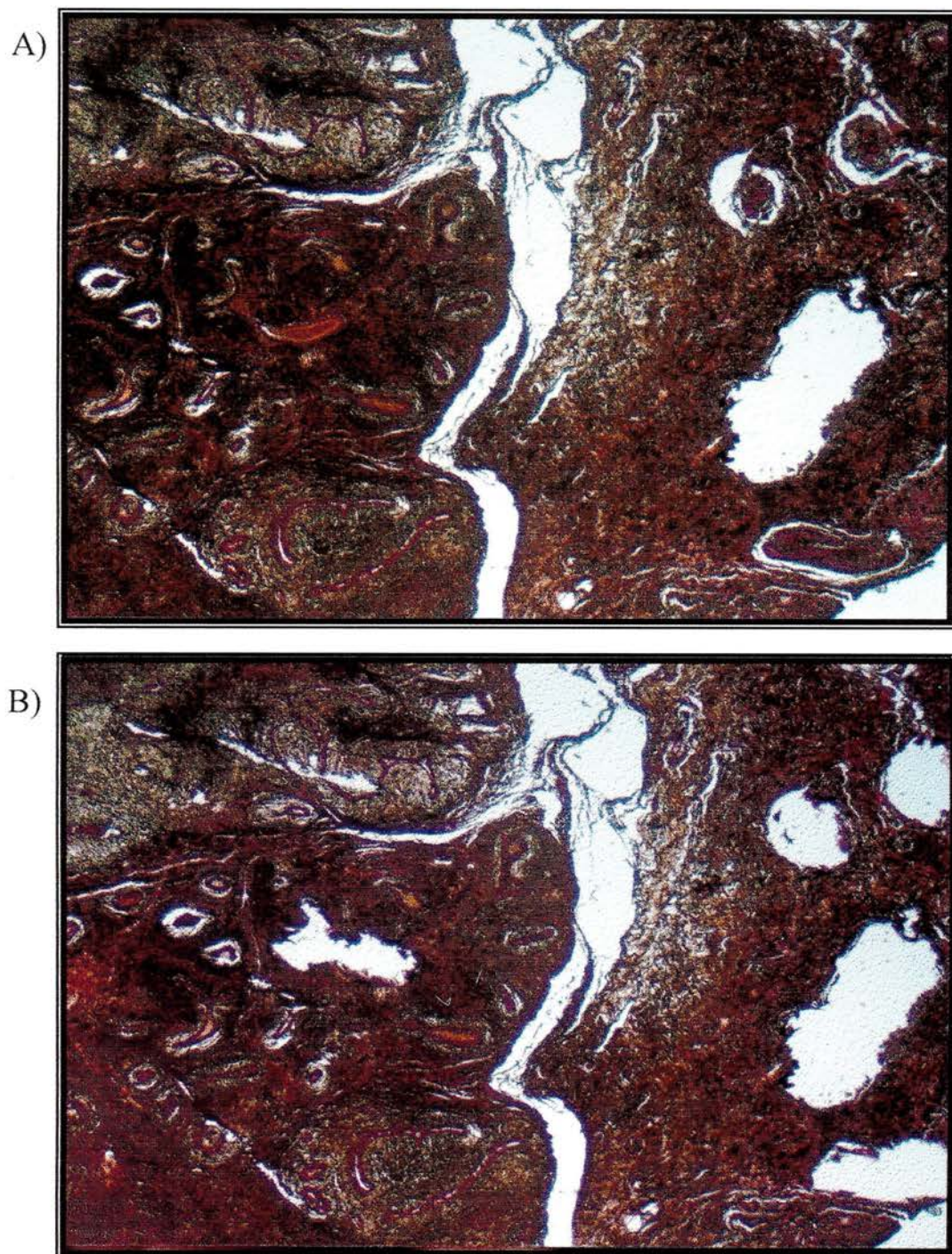


Figura 16 - A) e B) Etapas da microdissecção de tecido epitelial do fibroadenoma de mama (Continuação da figura 15). Lâminas coradas com Eosina - 40x.

RESULTADOS

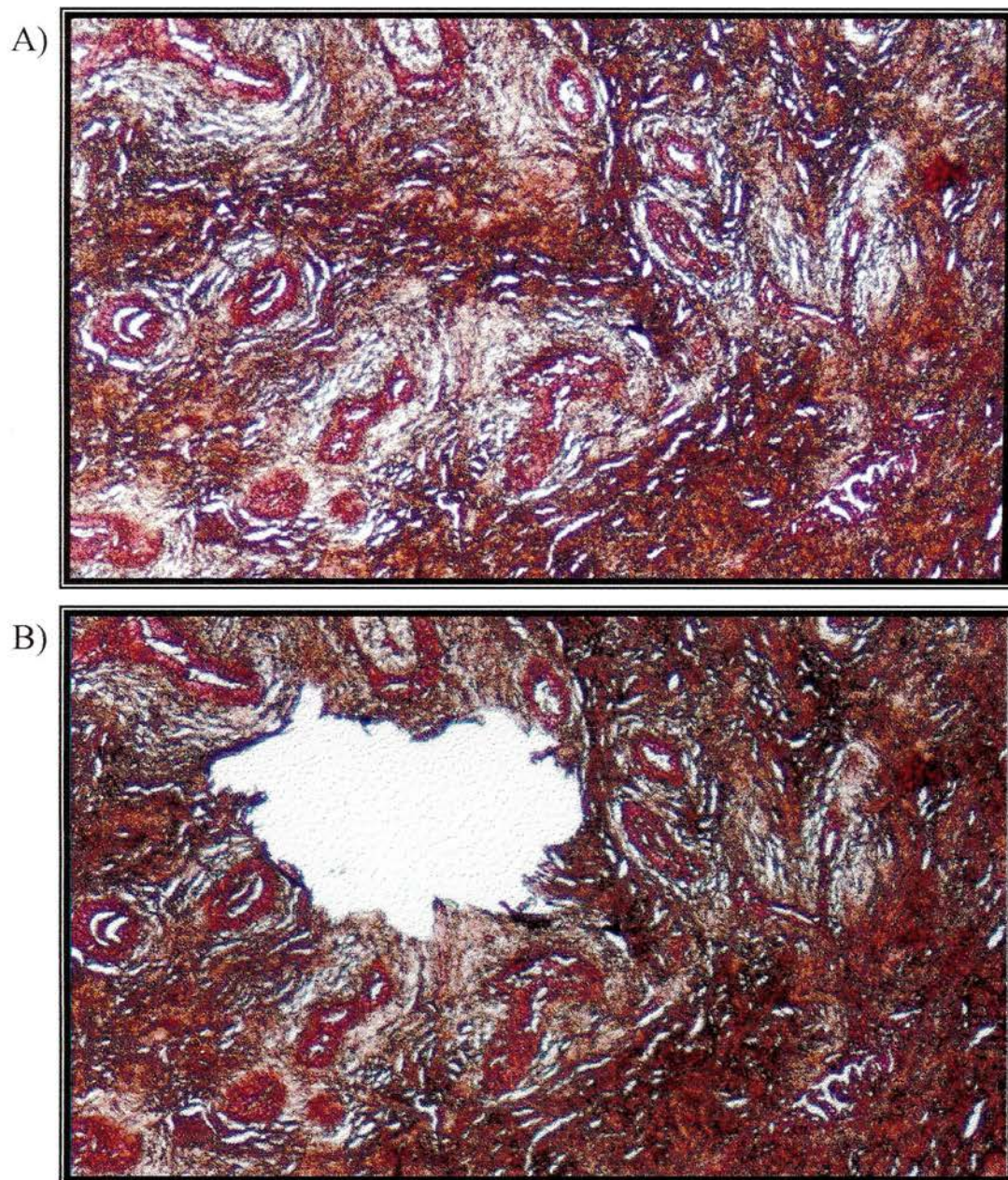


Figura 17 - Microdissecção do tecido estromal do fibroadenoma de mama.
A) Antes da microdissecção. B) Depois da microdissecção.
Lâminas coradas com Eosina - 100x.

RESULTADOS

A extração de DNA de 52 fibroadenomas (156 tubos de microcentrífuga) foi realizada, respeitando as condições estabelecidas em Materiais e Métodos.

Após a extração, foram feitas as reações de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando os primers: CI-373 - (3p); 249 - (6q); 219, 541, 574, 1735 e 1765 (10q); 860, W40 (11p), 439 (11q) e LH1/LH2 (TP53) - (17p) e 248 yg (17q). Os dados referentes ao *locus*, número de casos informativos e perda de heterozigose são mostrados na tabela 6.

TABELA 6 – Dados referentes ao *locus*, região cromossômica, número de casos informativos e perda de heterozigose (LOH).

<i>Locus</i>	Região Cromossômica	N Informativo/ N Casos	N LOH/ N informativo
D3S659	3p13	31/52	3/31
D6S249	6q16.3-q21	3/8	0/3
D10S219	10q22-23	15/26	0/15
D10S541	10q22-23	0/8	0/0
D10S574	10q22-23	11/16	0/11
D10S1735	10q22-23	0/9	0/0
D10S1765	10q22-23	8/31	0/8
D11S860	11p15	4/26	0/4
WT1	11p13	12/26	0/12
D11S439	11q24-q25	6/18	0/6
TP53	17p13.1	25/52	0/25
D17S855	17q12-q21	15/30	0/15

Fonte: Laboratório de Genética Molecular de Câncer – Departamento de Radiologia da FMUSP-2000.

RESULTADOS

Foram realizadas as reações com as amostras de fibroadenoma, utilizando todos os primers acima mencionados. Apesar da padronização (da fixação e da reação de PCR), detectamos uma diferença em seus resultados. Muitas das amostras não amplificaram, mesmo para repetidas reações, utilizando o mesmo primer ou outro diferente.

As reações que apresentaram maior grau de amplificação foram aquelas utilizando os primers CI3-373 para região 3p13 e LH1/LH2 (*TP53*) para região 17p 13.1.

Três das amostras analisadas apresentaram perda de heterozigose, para o marcador CI3-373 - D3S659 para a região 3p13, correspondendo a 9,6% (3 de 31 casos informativos). Reavaliemos os resultados, os quais foram confirmados. Não verificamos perda de heterozigose, em nenhuma das amostras analisadas para os outros primers. Apresentamos a seguir as figuras 18, 19 e 20, com os autoradiogramas e as densitometrias correspondentes às amostras com perda de heterozigose.

RESULTADOS

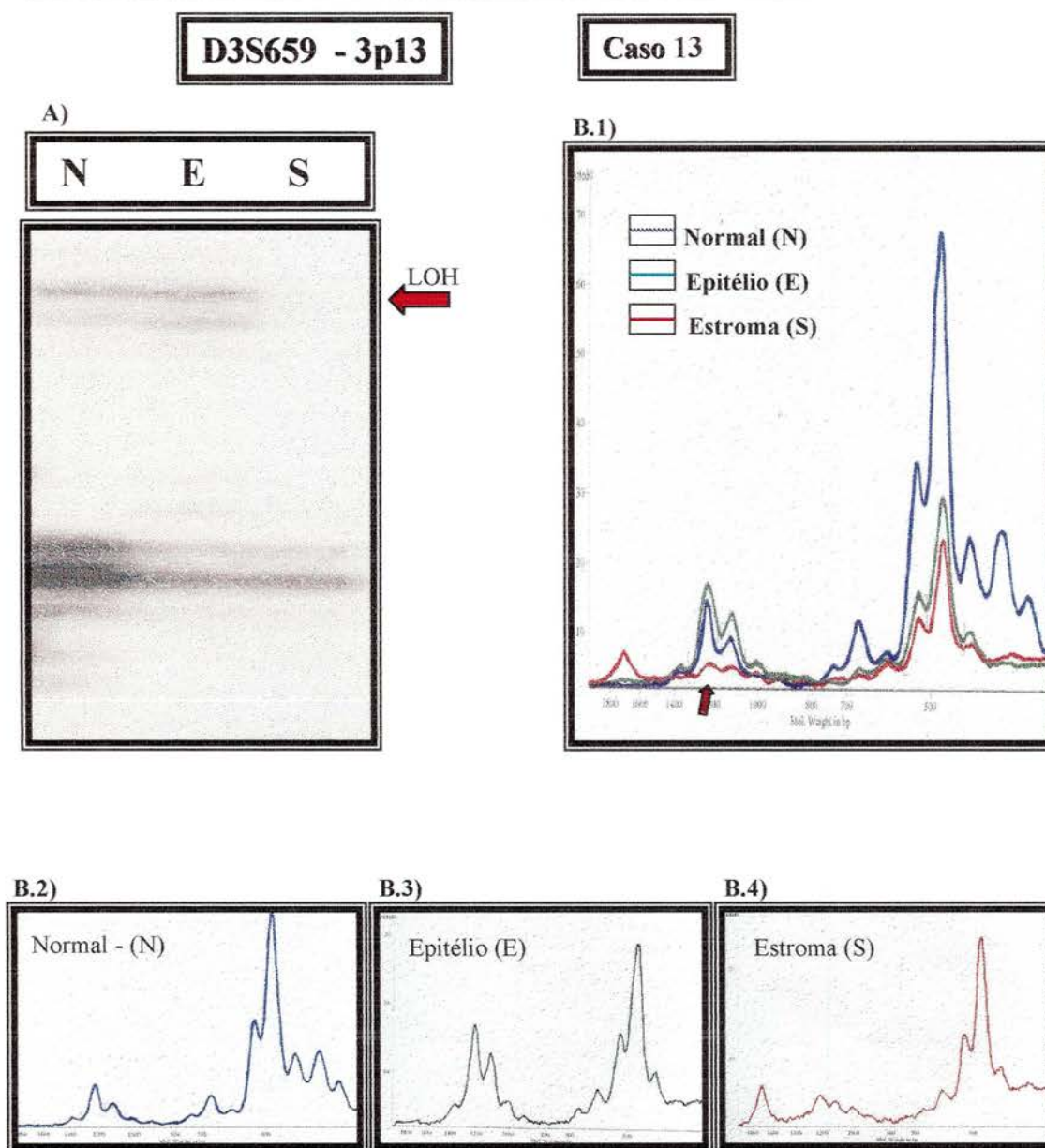


Figura 18 - A) Auto-radiograma do caso 13, demonstrando LOH no tecido estromal (S) do tumor e imbalance alélico no tecido normal adjacente ao tumor (N) no *locus* D3S659 na região cromossômica 3p13.

B) Densitometrias do caso 13.

B.1) Densitometria de todos os tecidos do Fibroadenoma - (N),(E),(S).

B.2) Densitometria do tecido normal adjacente ao tumor - (N).

B.3) Densitometria do tecido epitelial do Fibroadenoma - (E).

B.4) Densitometria do tecido estromal do Fibroadenoma - (S).

RESULTADOS

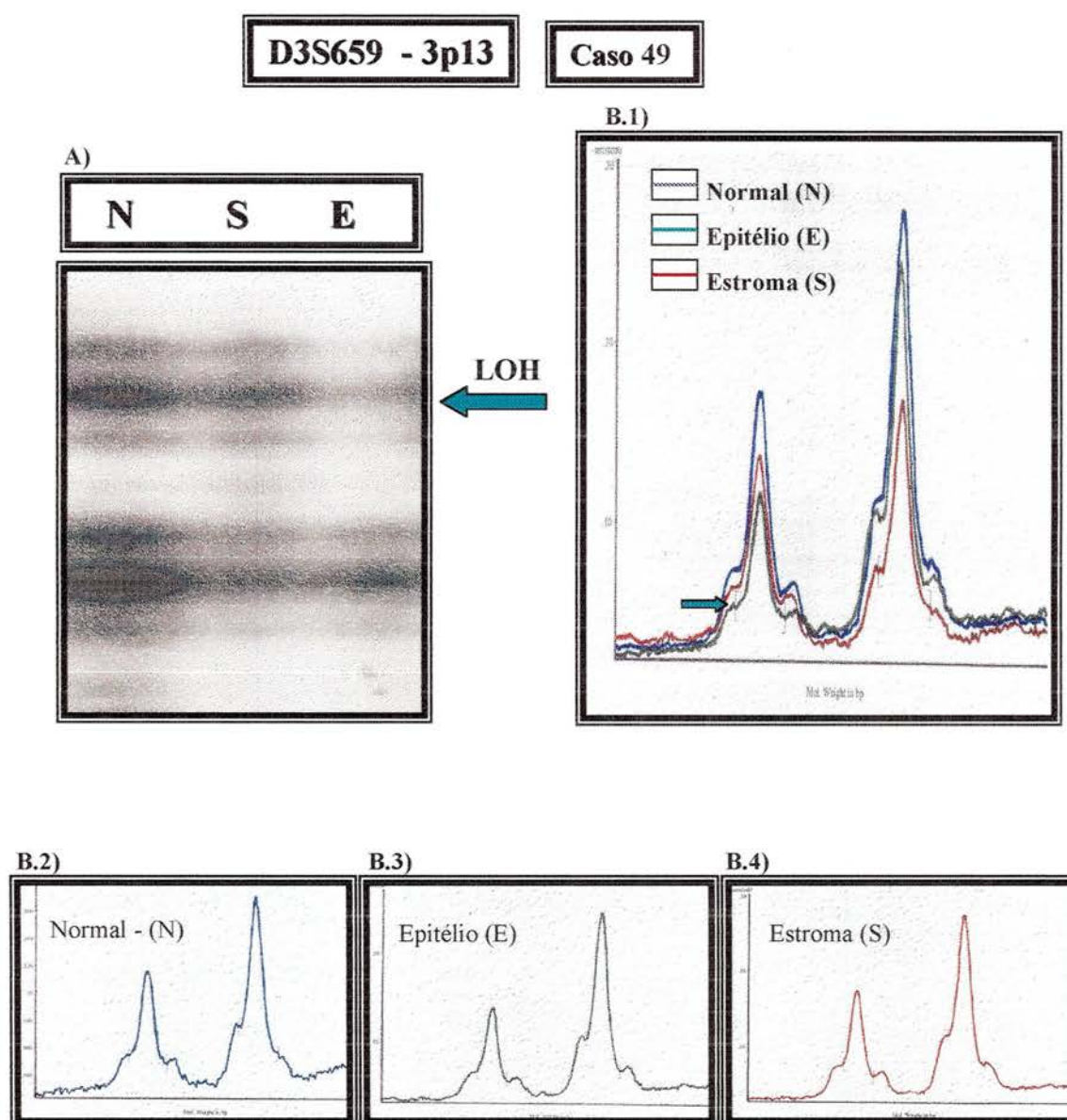


Figura 19 - A) Auto-radiograma do caso 49, demonstrando LOH no tecido epitelial (E) do tumor no *locus* D3S659 na região cromossômica 3p13.

B) Densitometrias do caso 49

B.1) Densitometria de todos os tecidos do Fibroadenoma - (N),(E),(S).

B.2) Densitometria do tecido normal adjacente ao tumor - (N).

B.3) Densitometria do tecido epitelial do Fibroadenoma - (E).

B.4) Densitometria do tecido estromal do Fibroadenoma - (S).

RESULTADOS

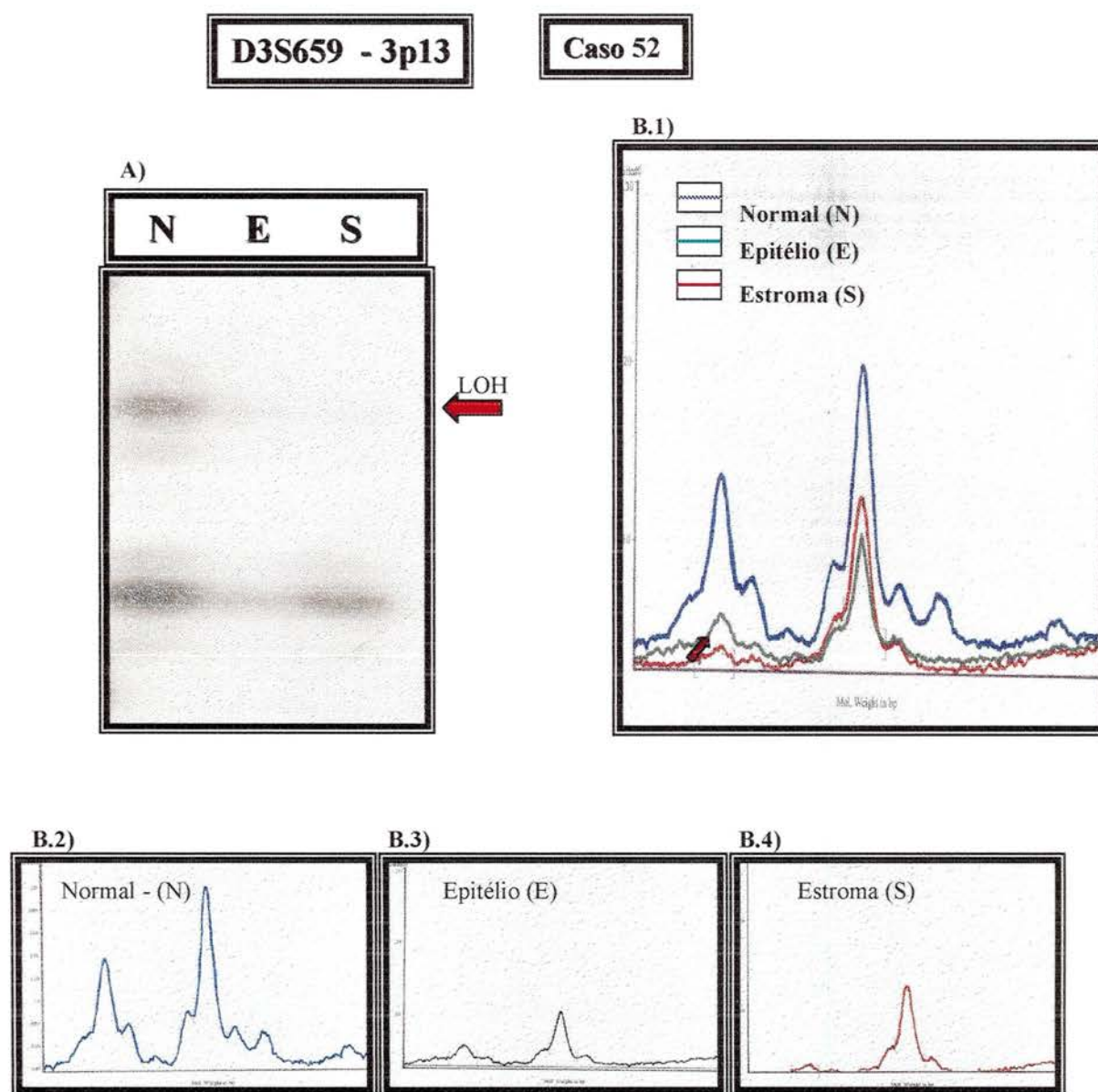


Figura 20 - A) Auto-radiograma do caso 52, demonstrando LOH no tecido estromal (S) do tumor no *locus* D3S659 na região cromossômica 3p13.

B) Densitometrias do caso 52.

B.1) Densitometria de todos os tecidos do Fibroadenoma - (N),(E),(S).

B.2) Densitometria do tecido normal adjacente ao tumor - (N).

B.3) Densitometria do tecido epitelial do Fibroadenoma - (E).

B.4) Densitometria do tecido estromal do Fibroadenoma - (S).

RESULTADOS

O marcador CI3-771, para o locus D3S966, mapeado na região cromossômica 3p21.3, (com produto de amplificado de 147 bp – (AC)₂₃), também foi utilizado. A avaliação deste *locus* foi realizada para verificar a possível perda de heterozigose, para este marcador. Entretanto, não obtivemos sucesso na amplificação destas amostras.

Observamos que em 2 tumores (caso 13 e 52) houve perda de heterozigose no componente estromal do fibroadenoma. No caso 49 houve perda de heterozigose no componente epitelial. Também no caso 13, onde observamos perda de heterozigose para o componente estromal, notamos desequilíbrio genético no componente normal.

A análise do auto-radiograma do caso 52, mostra pouca densidade radiográfica na amostra do componente epitelial. Os experimentos foram repetidos e reanalisados, evidenciando-se uma diferença de massa no componente epitelial e somente perda de heterozigose no componente estromal.

As 3 amostras com perda de heterozigose para a região cromossômica 3p13, foram analisadas com todos os outros primers, não sendo observado nenhuma alteração.

Os dados clínico-cirúrgicos das 3 pacientes que apresentaram perda de heterozigose para o braço curto do cromossomo 3 são apresentados na tabela 7.

TABELA 7 - Dados clínico-cirúrgicos de 3 pacientes com perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3:

Caso	Idade	Raça	Fumo	Menarca	Gestação	Idade do 1º filho	Lactação	História familiar	Uso de Medicação	Cirurgia prévia de mama	Clínica	Nº de Nódulo	Local	Tamanho Nódulo
13	51	I(*)	Não	13	4	25	Sim	Outros CAs	Não	Sim(**)	Nódulo + Outros	Múltiplo (***)	Bilateral (****)	5 cm
49	17	I(*)	Não	13	0	--	---	Não	Não	Não	Nódulo + Outros	Único	Mama Direita	3 cm
52	19	Branca	Não	12	0	--	---	Não	Não	Não	Nódulo + Outros	Único	Mama Esquerda	2 cm

Fonte: Arquivo do Hospital Pérola Byington (CRSMNADI)- 2000

* = ignorado

** = Tumorectomias por fibroadenoma.

***= Paciente com múltiplos nódulos, porém realizado tumorectomia de um único nódulo.

****= Paciente com nódulos bilaterais, porém realizado tumorectomia esquerda.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O Fibroadenoma é o tumor benigno de mama mais freqüente em mulheres, composto por tecido epitelial e estromal. Sua etiologia ainda é desconhecida. Devido a existência de poucos estudos moleculares em fibroadenoma de mama e visando identificar alguns fatores que estejam implicados na gênese destes tumores, foi realizado este estudo molecular em 52 pacientes portadoras deste tumor de mama.

Neste estudo, observamos que a idade das pacientes com fibroadenoma de mama está em concordância com a descrita na literatura (GEBRIN 1990; HOULIHAN 1991; ALLE *et al.* 1996). As pacientes apresentavam-se numa faixa etária predominantemente dentro do período reprodutivo, com uma média de 30 anos de idade. A maioria não fumava (67,3%). Vinte e duas pacientes eram brancas, 16 não brancas e 11 apresentavam dados ignorados. Na literatura, observa-se um leve predomínio da raça negra (DENT E CANT 1989; BARROS e RUIZ 1994).

Os dados clínicos-cirúrgicos deste trabalho mostraram que a maioria das pacientes apresentavam nódulos únicos (79,6%), com predominância na mama esquerda (47%). Não apresentavam filhos (44,9%), sem história prévia (83,7%) ou familiar (44,9%) para neoplasias, sem uso de contraceptivo oral ou medicamentos (73,5% e 81,7% respectivamente) e a média do tamanho do nódulo foi de 2,9 cm (variando de 1,5 - 6,5 cm). A média de idade da menarca das pacientes foi de 13 anos. Estes resultados estão em concordância com os dados demonstrados em outros trabalhos (ALLE *et al.* 1996, OLIVEIRA 1997; TAVANI 1999).

O material tumoral proveniente de cirurgia foi fixado em formol 10% e

DISCUSSÃO

emblocado em parafina. Foram realizados 3 cortes de 5 μ para cada tumor. Os trabalhos prévios utilizaram cortes variando de 2 à 15 μ . (BIANCHI *et al.* 1991; LAKHANI *et al.* 1995; ZHUANG *et al.* 1995; NAYAR *et al.* 1997). Na fase de padronização, realizamos primeiramente cortes com 10 μ e posteriormente, com 5 μ . Na prática, observamos não haver diferença nas espessuras dos cortes. Optamos por cortes de 5 μ , pois é o mais utilizado nos laboratórios e também é o mais mencionado nas técnicas de microdissecção. O número de lâminas padronizadas para microdissecção foi de 2 lâminas por tumor. Este é o número recomendado, em estudo prévio desta técnica (NAYAR *et al.* 1997).

O corante utilizado no preparo da lâmina anatomopatológica pode interferir na reação em cadeia da polimerase (PCR). A Eosina é um corante com a propriedade de agregar-se somente às proteínas do citoplasma, e por isto sua utilização isolada, na lâmina, não interfere na PCR. Este fato foi comprovado, previamente, em estudos utilizando-se apenas este corante (CHUAQUI *et al.* 1996; NAYAR *et al.* 1997). Esta técnica permite o exame e a microdissecção da lâmina sob visão direta do pesquisador, com maior precisão. Algumas pesquisas em que a técnica de microdissecção foi realizada em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), fazem-na, sob visualização indireta. A lâmina corada com HE é utilizada como guia, demarcando a área correspondente na lâmina parafinada, sem corante, a ser microdissecada (ROSENBERG *et al.* 1997; KASAMI *et al.* 1997, 1998; MARSH *et al.* 1998).

DISCUSSÃO

GUPTA *et al.* 1997, descreveram uma técnica em que utilizaram uma lâmina corada com HE e, sobre esta lâmina anatomopatológica, aplicaram um filme de silicone (sellotape). A seguir comprimiram a lâmina ao sellotape, digitalmente, e iniciaram a microdissecção com lâmina de bisturi número 11, com visualização direta da área a ser microdissecada. Estes autores advogam a diminuição dos tremores de quem está microdissecando e a ressecção da área alvo em bloco. Na prática, constatamos que tanto a técnica utilizando lâmina corada com HE, servindo como guia, quanto a técnica utilizando filme de silicone, são de baixa acuidade e com grandes probabilidades de contaminação de tecidos.

Os instrumentos de microdissecção utilizados foram: microscópio, tubos de microcentrífuga, luvas cirúrgicas e agulhas 25 X 7 gauge estéreis. Na fase de padronização, utilizamos agulhas com calibre maior, menor e lâminas de bisturi. As agulhas muito finas são maleáveis e as agulhas grossas e lâminas de bisturi atrapalham a microdissecção, pelo seu tamanho, danificando o material e promovendo a contaminação de tecidos. As lâminas de bisturi são ideais apenas para a microdissecção de tecidos periféricos, como por exemplo, o tecido normal adjacente ao tumor.

O uso de método como microdissecção de tecido tem aumentado a sensibilidade e especificidade das análises moleculares. Neste trabalho, utilizamos o microscópio óptico de 4 objetivas (Olympus BHC) e agulhas 25 X 7 gauge, disponíveis em nosso laboratório, que demonstraram ser um instrumental adequado à

DISCUSSÃO

experimentação, expressando resultados mais precisos. O microscópio invertido também pode ser utilizado, apresentando como vantagem um maior espaço entre a objetiva e a lâmina anatomopatológica, permitindo assim, uma maior e melhor manipulação.

Atualmente, com a alta tecnologia, existem alguns estudos, em vários tecidos, incluindo mama, usando a técnica de microdissecção à laser (EMMERT-BUCK *et al.* 1996; VOLCKE *et al.* 1996; BONNER *et al.* 1997; OSIN *et al.* 1998; SIMONE *et al.* 1998; NHI 2000). Esta técnica utiliza microscópios propriamente adaptados, não havendo manipulação direta do pesquisador. É o método ideal para tumores heterogêneos e policlonais, como os fibroadenomas, embora seja um instrumental caro e não disponível na maioria dos laboratórios.

A extração de DNA foi realizada inicialmente na fase de padronização pelo método de fenol clorofórmio. Por se tratar de pequena quantidade de material, optamos pela adição de Proteinase K e solução tampão, sem posterior purificação. Na fase de padronização, utilizamos as quantidades de 0,1, 0,2 e 0,5 µl de Proteinase K a 20mg/ml e 10, 20 e 50 µl de solução tampão, respectivamente. Verificamos que 0,5 µl de Proteinase K e 50 µl de solução tampão foi o ideal neste experimento. Na literatura, estas quantidades de Proteinase K e solução tampão também variam (BIANCHI *et al.* 1991; ZHUANG *et al.* 1995; KASAMI *et al.* 1997; NAYAR *et al.* 1997).

Uma constatação deste estudo é a amplificação variável destas amostras.

DISCUSSÃO

Muitos componentes tumorais (estroma e epitélio) e componente normal não amplificaram, ou somente alguns deles amplificaram. Alguns fatores devem ser considerados. Trabalhamos com amostras de tecido fixados em formol, emblocados em parafina, com extratos de DNA, ou seja, amostras não purificadas, com quantidade limitada de tecido e com massas de componentes tumorais diferentes. É importante considerar o padrão de cada tumor com alguns marcadores. Em nosso laboratório, em estudo prévio de desenho semelhante a este e utilizando técnica de microdissecção em tumores de cabeça e pescoço com marcadores semelhantes, obtivemos resultado de LOH alto, com um grau de amplificação de suas amostras também grande.

Os marcadores de microssatélites utilizados foram aqueles que estão mapeados em regiões cromossômicas mais freqüentemente pesquisadas para câncer de mama. Na maioria dos casos, utilizamos apenas um marcador para cada região cromossômica determinada no projeto. Não utilizamos outros marcadores e também não realizamos mais experimentos, devido ao resultado insatisfatório das amplificações e a pequena quantidade de DNA obtida.

As deleções no braço curto do cromossomo 3 têm sido encontradas em muitos tipos de tumores, como carcinomas de cabeça e pescoço, pulmão, tireóide, ovário e carcinoma de mama (AH-SEE *et al.* 1994; AHMADIAN *et al.* 1997; GREBE *et al.* 1997; MATSUMOTO *et al.* 1997; SUNDARESAN 1998; FULLWOOD 1999; MIRACCA *et al.* no prelo).

DISCUSSÃO

Neste estudo, evidenciamos a perda de heterozigose para o braço curto do cromossomo 3, em três amostras de fibroadenoma de mama, correspondendo a 9,6% (3/31) dos casos informativos. Este resultado corrobora com dados de estudos citogenéticos prévios, que indicam que esta região do braço curto do cromossomo 3 está envolvida na gênese dos tumores benignos e malignos de mama (DIETRICH *et al.* 1995; PANDIS *et al.* 1997; LUNDIN *et al.* 1998). Através de estudos moleculares, apenas MCCULLOCH *et al.* 1998, detectaram um caso de perda de heterozigose na região do braço curto do cromossomo 3 (3p21-14.2).

Estudos Citogenéticos em Fibroadenomas para a Região 3p:

Dentre os estudos citogenéticos, STEPHENSON *et al.* 1992, relataram uma paciente com fibroadenoma de mama com translocação t(3;5) (p22;q13).

DIETRICH *et al.* 1995, sugeriram que alterações no braço curto do cromossomo 3 ocorrem precocemente na progressão para lesões tipicamente associadas com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama. Em seus estudos citogenéticos mostraram deleções na região cromossômica 3p, detectadas em 3 de 11 lesões proliferativas benignas (hiperplasia ductal atípica e papiloma intraductal), porém, não detectaram perda de heterozigose em fibroadenomas.

Outro estudo citogenético, realizado por PETERSSON *et al.* 1997, analisou 50 fibroadenomas de mama, identificando alterações clonais em 9 destes tumores. Um destes tumores, apresentava um rearranjo intracromossomal complexo do cromossomo 3.

DISCUSSÃO

Estudos Moleculares em Fibroadenomas:

LALLE *et al.* 1994, publicaram o primeiro estudo molecular detectando 2 casos de perda de heterozigose para a região cromossômica 17q12-q21 em fibroadenomas, em um contexto familiar.

LIZARD-NACOL *et al.* 1995, pesquisaram 37 amostras de fibroadenoma de mama. Estes autores, analisaram 8 *loci* para perda de heterozigose, incluindo o braço curto do cromossomo 3. Não encontraram LOH para nenhum dos *loci* examinados.

KASAMI *et al.* 1998, estudando a clonalidade dos fibroadenomas, utilizaram uma técnica de microdissecção de tecidos onde as lâminas eram coradas com Hematoxilina-Eosina e utilizavam lâminas guia. Estes autores verificaram que dentre os 45 tumores, 5% (1/20) dos fibroadenomas complexos e 4% (1/25) dos fibroadenomas simples eram monoclonais. Porém, o componente epitelial de ambos era policlonal. No caso em que o fibroadenoma simples era monoclonal, foi observada a presença de padrão misto, com componente filóides e estromal.

MCCULLOCH *et al.* 1998, estudaram a incidência de instabilidade de microssatélites e LOH em fibroadenomas. Encontraram 4/39 casos (10%) de LOH e 3/39 (8%) casos de instabilidade de microssatélites em amostras informativas de fibroadenomas de mama. Dentre os casos de LOH verificados em fibroadenomas, em 1 caso de 32 (3,1%) apresentava perda para a região 3p21-14.2, *locus* D3S1514. Os autores estudaram os fibroadenomas de uma forma geral. Na análise, consideraram os fibroadenomas simples e complexos, sem distinção, não separando seus

DISCUSSÃO

componentes celulares (estroma, epitélio e tecido normal adjacente).

EUHUS *et al.* 1999, descreveram uma alta frequência de LOH na região cromossômica 3p em lesões benignas de mama, precedendo um diagnóstico de câncer de mama. Para as mulheres que desenvolveram câncer de mama, a proporção de LOH nos tumores de pacientes com lesões proliferativas foi de 0,47, quando comparada a 0,57 em pacientes com câncer de mama. Em fibroadenomas, estes autores não evidenciaram perda de heterozigose.

Neste trabalho, foi observado 3 casos de perda de heterozigose na região cromossômica 3p13. Estes dados preliminares de perda de heterozigose são importantes, embora ainda sejam um número pequeno de amostras e em apenas um marcador para esta região. Tendo-se que os poucos estudos em fibroadenoma de mama são na maioria experimentos citogenéticos e com poucos resultados, consideramos estes dados importantes, por se tratar de um estudo molecular em fibroadenoma simples.

Além deste estudo, apenas o de MCCULLOCH *et al.* 1998, evidenciaram perda de heterozigose em 1 fibroadenoma de mama para a região cromossômica 3p. Entretanto, evidenciamos perda em *locus* diferente (D3S659) e estudamos apenas fibroadenoma simples, utilizando técnica de microdissecção, separando os componentes deste tumor.

DISCUSSÃO

Dentre os 3 casos de perda de heterozigose, para a região cromossômica 3p13, detectados em nosso trabalho, houve 2 amostras em que ocorreu perda no componente estromal e 1 amostra com perda no componente epitelial. Tomando-se como base o modelo de BIÈCHE e LIDEREAU 1995, para a progressão tumoral, se esperaria encontrar apenas alterações em componentes epiteliais. As alterações genéticas em componentes estromais de fibroadenomas de mama foram também demonstradas por outros pesquisadores (FLETCHER *et al.* 1991; BELDA *et al.* 1993, NOGUCHI *et al.* 1993), através de estudos citogenéticos. As alterações observadas no componente estromal corroboram com o modelo de progressão para fibroadenomas, sugerido por NOGUCHI *et al.* 1993, em que o fibroadenoma pode evoluir para um tumor filóide ou a outro tumor de linhagem mesenquimal. A ocorrência de alterações genéticas, no componente epitelial do fibroadenoma, o que constatamos em 1 caso em nosso trabalho, pode sugerir um caminho para a transformação maligna epitelial da mama. Esta transformação do componente epitelial é um fato muito mais raro de ser evidenciado na literatura, variando de 0,12 à 0,3% (ALLE *et al.* 1996). Em um dos casos analisados, observamos desequilíbrio alélico no componente normal do fibroadenoma e perda de heterozigose no componente estromal. O desequilíbrio alélico no componente normal pode ser justificado, por estarmos trabalhando com tecido normal adjacente ao tumor. DENG *et al.* 1996, analisaram LOH em tecido normal adjacente ao câncer de mama, utilizando 15 marcadores, e constataram que a alteração mais freqüente foi na região

DISCUSSÃO

cromossômica 3p22-25 (de 10 casos com LOH no tumor, 6 apresentavam alterações em tecido normal adjacente). LARSON *et al.* 1998, verificaram clones geneticamente anormais, em 22% de amostras normais de 50% das mulheres com risco para câncer de mama. Observaram que mulheres abaixo de 50 anos de idade, sem doença, ou seja, com tecidos de mama histologicamente normais, porém, com aumento da taxa de anormalidades genéticas, apresentam um risco de desenvolver câncer de mama aumentado. Estes autores relacionam estes clones a etapas precoces da tumorigênese.

Alguns estudos moleculares, utilizando FISH e análise de LOH tem sido realizados, com o intuito de identificar regiões cromossômicas alteradas que possam indicar a implicação de novos genes supressores de tumor envolvidos na gênese tumoral. A maioria dos genes supressores de tumor já clonados foram identificados por estudos de ligação genética e LOH. Alguns autores estão estudando genes como o *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*) e o gene *PTPRG*, ambos identificados na região cromossômica 3p14.2 que também são candidatos a genes supressores de tumor, em câncer de mama e outros tumores primários (NEGRINI *et al.* 1996; PANAGOPOULOS *et al.* 1996; AHMADIAN *et al.* 1997; HAYASHI *et al.* 1997; BIÈCHE *et al.* 1998). Também implicados na tumorigênese de mama está o gene *DUTTI* (identificado na região 3p12) e um *locus* (D3S1207), identificado por FISH, mapeado para a região 3p26-pter (HEPPELL-PARTON *et al.* 1993; SUNDARESAN *et al.* 1998).

DISCUSSÃO

Analizando todos os estudos realizados em fibroadenoma de mama, consideramos positivo o resultado de perda de heterozigose, encontrado na região do cromossomo 3p13, demonstrando que estas alterações genéticas estão presentes nos fibroadenomas simples. O conhecimento destas alterações nos levará ao entendimento do desenvolvimento destes tumores. Analisando os resultados obtidos, verificamos que dentre as 3 pacientes com fibroadenomas de mama com perda de heterozigose para a região 3p13, somente uma delas apresentou dados clínico-cirúrgicos diferentes da média das pacientes. Esta paciente, classificada para o estudo como caso 13, tinha 51 anos de idade, com história familiar de cânceres de tubo digestivo e com história prévia pessoal de fibroadenoma (exérese prévia há 1 ano de nódulo fibroadenomatoso). Na sua história gestacional teve 4 filhos e amamentou todos. Apresentava ao momento da cirurgia, nódulos bilaterais, sendo ressecado um nódulo de 5 cm de diâmetro, incluído neste estudo. As outras duas pacientes apresentavam dados compatíveis com os descritos pela literatura (FECHNER 1987; GEBRIN 1990; HOULIHAN 1991; OLIVEIRA 1997).

Estes dados preliminares revelam que a perda de heterozigose na região cromossômica 3p13 sugere a implicação de um provável gene supressor de tumor, nesta região, como um evento precoce, ocorrendo na gênese dos fibroadenomas de mama.



DISCUSSÃO

O campo para exploração e estudo dos fibroadenomas simples, complexos e de outras lesões da mama, permanece aberto, para um melhor conhecimento do desenvolvimento destes tumores.

Este trabalho é um dos raros estudos moleculares existentes demonstrando perda de heterozigose em fibroadenomas de mama. Além disso, é o primeiro estudo, que evidencia LOH em fibroadenomas simples, sendo original ao pesquisar por meio de microdissecção dos componentes celulares do fibroadenoma de mama (tecido estromal, epitelial e normal adjacente) utilizando visualização direta e lâminas coradas com Eosina. À análise molecular de cada tecido foi realizada por meio de marcadores de DNA do tipo microssatélite e reação em cadeia da polimerase, utilizando apenas amostras de fibroadenoma simples.

A identificação de perda de heterozigose nos componentes estromal e epitelial em fibroadenomas simples sugere duas possíveis vias de transformação maligna. Um caminho, com alterações genéticas no componente estromal, seguindo a direção para fibroadenomas complexos, tumores filóides e outros tumores mesenquimais (corroborando o modelo de NOGUCHI *et al.* 1993, em que o fibroadenoma de mama pode progredir para tumor filóide). E um segundo caminho, em que há alterações no componente epitelial, indo em direção às lesões epiteliais e ao carcinoma de mama (mais raro).

DISCUSSÃO

Devemos considerar também a influência bidirecional do tecido epitelial e estromal. SAWHNEY *et al.* 1992, através de estudo morfológico realizado em tumores fibroepiteliais, sugeriram a hipótese de que o crescimento de tumores fibroepiteliais depende de vários fatores do componente epitelial. Uma interação no sentido oposto também pode ocorrer, porém não há estudos comprovando este mecanismo inverso.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Os dados preliminares deste estudo demonstram a ocorrência de perda de heterozigose na região cromossômica 3p13 em fibroadenoma simples de mama.
2. Ausência de perda de heterozigose nas outras regiões cromossômicas pesquisadas em fibroadenoma simples de mama.
3. As alterações genéticas encontradas denotam a provável localização de um gene supressor de tumor na região cromossômica 3p13, eventualmente associado ao desenvolvimento dos fibroadenomas de mama.
4. A evidência de alteração genética em fibroadenoma simples sugere o envolvimento precoce na tumorigênese.
5. A perda de heterozigose detectada no componente epitelial (1 caso) e no componente estromal (2 casos), sugere um modelo com duas possíveis vias para a gênese dos tumores de mama, a partir do fibroadenoma. Uma via, seguindo o caminho de alterações sucessivas no componente estromal, ou seja, com o acúmulo sucessivo de alterações neste tecido, poderia levar ao desenvolvimento de fibroadenomas complexos, tumor filóide e outros tumores mesenquimais, e a outra via, seguindo o caminho de alterações sucessivas no componente epitelial, poderia levar à lesões epiteliais benignas e posteriormente ao carcinoma de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian M, Wistuba II, Fong KM, Behrens C, Kodagoda DR, Saboorian MH, Shay J, Tomlinson GE, Blum J, Minna JD, Gazdar AF. Analysis of the *FHIT* and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer Res** 1997; 57:3664-8.

Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. **Cancer Res** 1994; 54:1617-21.

Alle KM, Moss J, Venegas RJ, Khalkhali I, Klein SR. Conservative management of fibroadenoma of the breast. **Br J Surg** 1996; 83:992-3.

Balakrishnan A, Yang J, Beattie CW, Das Gupta TK, Nandi S. Estrogen receptor in dissociated and cultured human breast fibroadenoma epithelial cells. **Cancer Lett** 1987; 34:233-42.

Barros ACSD, Ruiz CA. Fibroadenoma simples. In: Halbe HW. **Tratado de ginecologia**. 2ª ed. São Paulo: Rocca; 1994. p.1013-5.

Barros ACSD, Pinotti JA. Bases da carcinogênese mamária. In: Dias EN, Silva HMS, Barros ACSD, Figueira Filho ASS. **Controvérsias em mastologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. P.65-80.

Barth V, Prechtel K. Fibroadenoma, adenofibroma, tumor "phyllodes", fibromatosis, miofibroblastoma. In: Barth V, Prechtel K. **Atlas de patología de la glándula mamaria: sinopsis de clínica, morfología y radiología con fundamentos de técnicas diagnósticas especiales**. 2ª ed. Madrid: Ed. Medica Panamericana; 1991. p. 63-75.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belda F, Lester SC, Pinkus JL, Pinkus GS, Fletcher JA. Lineage-restricted chromosome translocation in a benign fibrous tumor of the breast. **Hum Pathol** 1993; 24: 923-7.
- Bianchi AB, Navone NM, Conti CJ. Detection of loss of heterozygosity in formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens by the polymerase chain reaction. **Am J Pathol** 1991; 138:279-84.
- Bièche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes Chromosom Cancer** 1995; 14:227-51.
- Bièche I, Latil A, Becette V, Lidereau R. Study of *FHIT* transcripts in normal and malignant breast tissue. **Genes Chromosom Cancer** 1998; 23:292-9.
- Bodian CA, Perzin KH, Lattes R, Hoffmann P, Abernathy TG. Prognostic significance of benign proliferative breast disease. **Cancer** 1993; 71:3896-907.
- Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. **Science** 1997; 278:1481-3.
- Bruford MW, Wayne RK. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Curr Opin Genet Dev** 1993; 3:939-43.
- Buchhagen DL, Qiu L, Etkind P. Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast cancer development. **Int J Cancer** 1994; 57:473-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Callahan R, Cropp CS, Merlo GR, Liscia DS, Cappa APM, Lidereau R. Somatic mutations and human breast cancer. **Cancer** 1992; 69:1582-8.

Carter CL, Corle DK, Micozzi MS, Schatzkin A, Taylor PR. A prospective study of the development of breast cancer in 16,692 women with benign breast disease. **Am J Epidemiol** 1988; 128:467-77.

Carter D. Stromal neoplasms. In: Carter D. **Interpretation of breast biopsies**. 2^a ed. New York: Raven Press; 1990. p. 208-25. (Biopsy interpretation series)

Chen LC, Matsumura K, Deng G, Kurisu W, Ljung BM, Lerman MI, Waldman FM, Smith HS. Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. **Cancer Res** 1994; 54:3021-4.

Cho KR, Hedrick L. Genetic alterations in human tumors. **Curr Top Microbiol Immunol** 1997; 221:149-76.

Chuaqui R, Vargas MP, Castiglioni T, Elsner B, Zhuang Z, Emmert-Buck M, Merino MJ. Detection of heterozygosity loss in microdissected fine needle aspiration specimens of breast carcinoma. **Acta Cytol** 1996; 40:642-8.

Collins N, McManus R, Wooster R, Mangion J, Seal S, Lakhani SR, Ormiston W, Daly PA, Ford D, Easton DF, Stratton MR. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the *BRCA2* gene on chromosome 13q12-13. **Oncogene** 1995; 10:1673-5.

Corvello CM. Genética molecular do câncer de mama: predisposição e prognóstico. In: Rossi BM, Pinho M. **Genética e biologia molecular para o cirurgião geral**. São Paulo: Lemar; 1999. p. 201-11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Robbins pathologic basis of disease**. 5^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994.
- Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. **Science** 1996; 274:2057-9.
- Dent DM, Cant PJ. Fibroadenoma. **World J Surg** 1989; 13:706-10.
- Diaz NM, Palmer JO, McDivitt RW. Carcinoma arising within fibroadenomas of the breast. A clinicopathologic study of 105 patients. **Am J Clin Pathol** 1991; 95:614-22.
- Dietrich CU, Pandis N, Teixeira MR, Bardi G, Gerdes AM, Andersen JA, Heim S. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue. **Int J Cancer** 1995; 60:49-53.
- Dixon JM. Cystic disease and fibroadenoma of the breast: natural history and relation to breast cancer risk. **Br Med Bull** 1991; 47:258-71.
- Drukker BH. Breast disease: a primer on diagnosis and management. **Int J Fertil** 1997; 42:278-87.
- Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **N Engl J Med** 1985; 312:146-51.
- Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, Schuyler PA, Plummer WD. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. **Cancer** 1993; 71:1258-65.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dupont WD, Page DL, Parl FF, Vnencak-Jones CL, Plummer WD, Rados MS. Schuyler PA. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. **N Engl J Med** 1994; 331:10-5.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. **Science** 1996; 274:998-1001.
- Euhus DM, Maitra A, Wistuba II, Alberts A, Albores-Saavedra J, Gazdar AF. Loss of heterozygosity at 3p in benign lesions preceding invasive breast cancer. **J Surg Res** 1999; 83:13-8.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.
- Fechner RE. Fibroadenoma and related lesions. In: Page DL, Anderson T. **Diagnostic histopathology of the breast**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p. 72-85.
- Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of *PTEN* and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. **Oncogene** 1998; 16:1743-8.
- Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RVP. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer. An update of the 1985 consensus statement. **Arch Pathol Lab Med** 1998; 122:1053-5.
- Fletcher JA, Pinkus GS, Weidner N, Morton CC. Lineage-restricted clonality in biphasic solid tumors. **Am J Pathol** 1991; 138:1199-207.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Frykberg ER, Bland KI. *In situ* breast carcinoma. **Adv Surg** 1993; 26:29-72.

Fullwood P, Marchini S, Rader JS, Martinez A, Macartney D, Broggin M, Morelli C, Barbanti-Brodano G, Maher ER, Latif F. Detailed genetic and physical mapping of tumor supressor loci on chromosome 3p in ovarian cancer. **Cancer Res** 1999; 59:4662-7.

Gebrim LH. Fibroadenomas simples e hiperclular. In: Hegg R. **Doenças benignas da mama**. São Paulo: Sandoz; 1990. p. 5-11.

Gebrim LH, Bernardes Jr JRM, Nazário ACP, Kemp C, Lima GR. Malignant phyllodes tumor in the right breast and invasive lobular carcinoma within fibroadenoma in the other: case report. **São Paulo Med J** 2000; 118:46-8.

Grebe SKG, McIver B, Hay ID, Wu PSC, Maciel LMZ, Drabkin HA, Goellner JR, Grant CS, Jenkins RB, Eberhardt NL. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without *VHL* or *p53* mutations suggests involvement of unidentified tumor supressor genes in follicular thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metabol** 1997; 82:3684-91.

Gupta SK, Douglas-Jones AG, Morgan JM. Microdissection of stained archival tissue. **J Clin Mol Pathol** 1997; 50:218-20.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science** 1990; 250:1684-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000;100:57-70.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hauge XY, Litt R, Litt M. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D11S439 and HBB loci. **Hum Mol Genet** 1992; 7:548.
- Hayashi SI, Tanimoto K, Hajiro-Nakanishi K, Tsuchiya E, Kurosumi M, Higashi Y, Imai K, Suga K, Nakachi K. Abnormal *FHIT* transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. **Cancer Res** 1997; 57:1981-5.
- Henderson IC. Risk factors for breast cancer development. **Cancer** 1993; 71:2127-40.
- Heppel-Parton AC, Daly MC, Drabkin HA, Rabbitts PH. The probe BMS 1271 identifies a new polymorphic locus (D3S1207) and maps to 3p26-pter. **Cytogenet Cell Genet** 1993; 63:64-5.
- Houlihan MJ. Fibroadenoma and hamartoma. In: Harris JR, Hellman S, Henderson IC, Kinne DW. **Breast disease**. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1991. p. 45-8.
- Horobin RRW. **Histochemistry**. Stuttgart: Fisher & Butteerworhs; 1982.
- Hughes LE, Mansel RE, Webster DJT. Aberrations of normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. **Lancet** 1987; 12:1316-9.
- Hutchinson WB, Thomas DB, Hamlin WB, Roth GJ, Peterson AV, Williams B. Risk of breast cancer in women with benign breast disease. **J Natl Cancer Inst** 1980; 65:13-20.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Innis MA, Gelsand DH, Sninsky JJ, White TJ. **PCR Protocols. A guide to methods and applications.** New York: Academic Press; 1990.

Jones MH, Yamakawa K, Nakamura Y. Isolation and characterization of 19 dinucleotide repeat polymorphisms on chromosome 3p. **Hum Mol Genet** 1992a; 1:131-3.

Jones MH, Nakamura Y. Detection of loss of heterozygosity at the human *TP53* locus using a dinucleotide repeat polymorphism. **Genes Chromosom Cancer** 1992b; 51:3356-61.

Kasami M, Vnencak-Jones CL, Manning S, Dupont WD, Page DL. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast hyperplasia. No obligate correlation of these genetic alterations with subsequent malignancy. **Am J Pathol** 1997; 150:1925-32.

Kasami M, Vnencak-Jones CL, Manning S, Dupont WD, Jensen RA, Page DL. Monoclonality in fibroadenomas with complex histology and phyllodol features. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 50:185-91.

Kleihues P, Schäuble B, Zur Hausen A, Estève J, Ohgaki H. Tumors associated with *p53* germline mutations: a synopsis of 91 families. **Am J Pathol** 1997;150:1-13.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.

Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:10914-21.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Koreth J, O'Leary JJ, McGee JO'D. Microsatellites and PCR genomic analysis. **J Pathol** 1996; 178:239-48.

Krieger N, Hiat RA. Risk of breast cancer after benign breast diseases. Variation by histologic type, degree of atypia, age at biopsy, and length of follow-up. **Am J Epidemiol** 1992; 135:619-31.

Kurosumi M, Itokazu R, Mamiya Y, Kishi K, Takayama S, Nagasawa M, Kurihara T, Suemasu K, Higashi Y. Invasive ductal carcinoma with a predominant intraductal component arising in a fibroadenoma of the breast. **Pathol Int** 1994; 44:874-7.

Lage H, Dietel M. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. **J Cancer Res Clin Oncol** 1999; 156-65.

Lakhani SR, Collins N, Stratton MR, Sloane JP. Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. **J Clin Pathol** 1995; 48:611-5.

Lalle P, De Latour M, Rio P, Bignon YJ. Detection of allelic losses on 17q12-q21 chromosomal region in benign lesions and malignant tumors occurring in a familial context. **Oncogene** 1994; 9:437-42.

Larson PS, Las Morenas A, Cupples LA, Huang K, Rosenberg CL. Genetically abnormal clones in histologically normal breast tissue. **Am J Pathol** 1998; 156:1591-8.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Leone A, McBride OW, Weston A, Wang MG, Anglard P, Cropp CS, Goepel JR, Lidereau R, Callahan R, Linehan WM, Rees RC, Harris CC, Liotta LA, Steeg PS. Somatic allelic deletion of *nm23* in human cancer. **Cancer Res** 1991; 51:2490-3.

Leuschner E, Meyer-Bolte K, Caselitz J, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Fibroadenoma of the breast showing a translocation (6;14), a ring chromosome and two markers involving parts of chromosome 11. **Cancer Genet Cytogenet** 1994; 76:145-7.

Levi F, Randimbison L, Te VC, La Vecchia C. Incidence of breast cancer in women with fibroadenoma. **Int J Cancer** 1994; 57:681-3.

Lewin B. Oncogenes and cancer. In: Lewin B. **Genes VI**. Oxford: Oxford University Press; 1997. p.1131-72.

Lizard-Nacol S, Lidereau R, Collin F, Arnal M, Hahnel L, Roignot P, Cuisenier J, Guerrin J. Benign breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. **Cancer Res** 1995; 55:4416-9.

London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A Prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. **JAMA** 1992; 267:941-4.

Luna LG. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3^a ed. New York: McGraw-Hill; 1972.

Lundin C, Mertens F. Cytogenetics of benign breast lesions. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 51:1-15.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni Jr JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Marsh KL, Varley JM. Loss of Heterozygosity at chromosome 9p in ductal carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of the breast. **Br J Cancer** 1998; 77:1439-47.

Matsumoto S, Kasumi F, Sakamoto G, Onda M, Nakamura Y, Emi M. Detailed deletion mapping of chromosome arm 3p in breast cancers: a 2-cM region on 3p14.3-21.1 and a 5-cM region on 3p24.3-25 commonly deleted in tumors. **Genes Chromosom Cancer** 1997; 10:268-74.

May P, May E. Twenty years of *p53* research: structural and functional aspects of the *p53* protein. **Oncogene** 1999; 18:7621-36.

McCulloch RK, Sellner LN, Papadimitrou JM, Turbett GR. The incidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in fibroadenoma of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 49:165-9.

McDivitt RW, Stevens JA, Lee NC, Wingo PA, Rubin GL, Gersell D and the cancer and steroid hormone study group. Histologic types of benign breast disease and the risk for breast cancer. **Cancer** 1992; 69:1408-14.

McNoe LA, Eccles MR, Reeve AE. Dinucleotide repeat polymorphism at the D11S860 locus. **Nucleic Acids Res** 1992; 20:1160.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mettlin C. Breast cancer risk factors. Contributions to planning breast cancer control. **Cancer** 1992; 69:1904-10.

Miracca EC, Yamamoto L, Contado D, Takimoto MSS, Kowalski LP, Nagai MA. Distinct chromosomal deleted regions defining different subsets of head and neck tumors. **Diagn Mol Pathol** 2000; no prelo.

Morrison BW. The genetics of breast cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** 1994; 8:15-27.

Moskowitz M, Gartside P, Wirman JA, McLaughlin C. Proliferative disorders of the breast as risk factors for breast cancer in a self-selected screened population: pathologic markers. **Radiology** 1980; 134:289-91.

Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in *c-erbB-2* protooncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. **Oncology** 1993; 50:412-17.

Nagai MA. Oncogênese. In: Abraão FS. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca; 1995. p.17-37.

Nagai MA, organizadora. **Técnicas básicas de biologia molecular utilizadas no estudo de DNA e RNA**. São Paulo; 1998. (Apostila do 1º Curso de Biologia Molecular Aplicada à Oncologia - Faculdade de Medicina da USP)

Nayar R, Zhuang Z, Merino MJ, Silverberg SG. Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in lobular lesions of the breast using tissue microdissection and polymerase chain reaction. **Hum Pathol** 1997; 28:277-82.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NIH, NCICGAP Laser capture microdissection: protocols for LCM preparation and analysis / histological preparation for LCM. **The Cancer Genomic Anatomy Web Site**. [On line] 2000. [8 screens] Available from <URL:<http://dir.nichd.nih.gov/lcm/>>. [2000 Jan 17].

Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM. The *FHIT* gene 3p14.2 is abnormal in breast cancer carcinomas. **Cancer Res** 1996; 56:3173-9.

Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. **Cancer Res** 1993; 53:4071-4.

Noguchi S, Yokouchi H, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Progression of fibroadenoma to phyllodes tumor demonstrated by clonal analysis. **Cancer** 1995; 76:1779-85.

Odagiri E, Kanda N, Jibiki K, Demura R, Aikawa E, Demura H. Reduction of telomeric length and *c-erbB-2* gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. Relationship to histologic grade and clinical parameters. **Cancer** 1994; 73:2978-84.

Oliveira LFP. **Estudo do fibroadenoma da mama em mulheres com idade inferior a trinta anos**. São Paulo; 1997. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Osin P, Shipley YJL, Lu YJ, Crook T, Gusterson BA. Experimental pathology and breast cancer genetics: new technologies. **Recent Results Cancer Res** 1998; 152:35-48.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ozisik YY, Meloni AM, Stephenson CF, Peier A, Moore GE, Sandberg AA. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. **Cancer Genet Cytogenet** 1994; 77:125-8.
- Page DL, Simpson JF. Benign, high-risk, and premalignant lesions of the breast. In: Bland KI, Copeland III EM. **The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases**. 2ª ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 1998. p. 191-213.
- Panagopoulos I, Pandis N, Thelin S, Petersson C, Mertens F, Borg A, Kristoffersson U, Mitelman F, Aman P. The *FHIT* and *PTPRG* genes are deleted in benign proliferative breast disease associated with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosome band 3p14. **Cancer Res** 1996; 56:4871-5.
- Pandis N, Bardi G, Mitelman F, Heim S. Deletion of the short arm of chromosome 3 in breast tumors. **Genes Chromosom Cancer** 1997; 18:241-5.
- Pasqualini JR, Cortes-Prieto J, Chetrite G, Talbi M, Ruiz A. Concentrations of estrone, estradiol, and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. **Int J Cancer** 1997; 70:639-43.
- Petersson C, Pandis N, Rizou H, Mertens F, Dietrich CU, Adeyinka A, Idvall I, Bondeson L, Georgiou G, Ingvar C, Heim S, Mitelman F. Karyotypic abnormalities in fibroadenomas of the breast. **Int J Cancer** 1997; 70:282-6.
- Pinho M, Rossi BM. Câncer colorretal: modelo ideal para a compreensão da carcinogênese. In: Rossi BM, Pinho M. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar; 1999. p. 144-72.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Remer RA. O material genético: DNA, RNA, cromossomos e genes. In: Rossi BM, Pinho M. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar; 1999. p. 38-56.
- Roberts MM, Jones V, Elton RA, Fortt RW, Williams S, Gravelle IH. Risk of breast cancer in women with history of benign disease of the breast. **Br Med J** 1984; 288:275-8.
- Rohen C, Staats B, Bonk U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Significance of clonal chromosome aberrations in breast fibroadenomas. **Cancer Genet Cytogenet** 1996; 87:152-5.
- Rós N. **Análise da expressão e “imprinting” genômico dos genes IGF-2 e H19 em fibroadenomas de mama**. São Paulo; 1998. [Tese de Mestrado - Universidade de São Paulo].
- Rosenberg CL, Larson PS, Romo JD, De Las Morenas A, Faller DV. Microsatellite alterations indicating monoclonality in atypical hyperplasias associated with breast cancer. **Hum Pathol** 1997; 28:214-9.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988; 239:487-91.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sato T, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. **Cancer Res** 1991; 51:5794-9.
- Sawhney N, Chir MBB, Garrahan N, Douglas-Jones AG, Path FRC, Williams ED. Epithelial-stromal interactions in tumors: a morphologic study of fibroepithelial tumors of the breast. **Cancer** 1992; 70:2115-20.
- Schmutzler RK, Fimmers R, Bierhoff E, Lohmar B, Homann A, Speiser P, Kubista E, Jaeger K, Krebs D, Zeillinger R, Wiestler OD, Von Deimling A. Association of allelic losses on human chromosomal arms 11q and 16q in sporadic breast cancer. **Int J Cancer** 1996; 69:307-11.
- Sheng ZM, Marchetti A, Buttitta F, Champeme MH, Campani D, Bistocchi M, Lidereau R, Callahan R. Multiple regions of chromosome 6q affected by loss of heterozygosity in primary human breast carcinomas. **Br J Cancer** 1996; 73:144-7.
- Silveira LAL, Oliveira ACM, Melo SO. Fibroadenoma. In: Barros ACSD, Silva HMS, Dias EN, Nazario ACP, Figueira F^o ASS. **Mastologia. condutas**. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. p.46-9.
- Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. **Trends Genet** 1998; 14:272-6.
- Skaane P, Engedal K. Analysis of sonographic features in the differentiation of fibroadenoma and invasive ductal carcinoma. **AJR Am J Roentgenol** 1998; 170:109-14.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. **Science** 1991; 254:1153-60.

Staats B.; Bonk U, Wanschura S, Hanisch P, Schoenmakers EFPM, Van de Ven WJM, Bartnitzke S, Bullerdiek J. A fibroadenoma with a t(4;12) (q27;q15) affecting the *HMGI-C* gene, a member of the high mobility group protein gene family. **Breast Cancer Res Treat** 1996; 38:299-303.

Stephenson CF, Davis RI, Moore GE, Sandberg AA. Cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization analysis of breast fibroadenomas. **Cancer Genet Cytogenet** 1992; 63:32-6.

Strauss, LT. Fibroadenomas y tumores phyllodes. In: Munõz GAH, coordenador. **Avances en mastologia**. 2ª ed. Caracas: Ed. Dr. Gerardo A.H.Muñoz; 1996. p. 14-25.

Sundaresan V, Chung G, Heppel-Parton A, Xiong J, Grundy C, Roberts I, James L, Cahn A, Bench A, Douglas J, Minna J, Sekido Y, Lerman M, Latif F, Bergh J, Li H, Lowe N, Ogilvie D, Rabbitts P. Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer. **Oncogene** 1998; 17:1723-9.

Tadokoro K, Oki N, Sakai A, Fujii H, Ohshima A, Nagafuchi S, Inoue T, Yamada M. PCR detection of 9 polymorphisms in the *WT1* gene. **Hum Mol Genet** 1993; 2:2205-6.

Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Negri E, Montella M, Dal Maso L, Franceschi S. Risk factors for breast cancer in women under 40 years. **Eur J Cancer** 1999; 35:1361-7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tobias P, De Luca LA, Schmitt FCL, Frederigue Jr. U, Uemura G. Revisão histopatológica e análise dos fibroadenomas. **Rev Bras Mastol** 1999; 9:68-74.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med** 1988; 319:525-32.

Volcke CD, Pozzati RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. **Cancer Res** 1996; 56:2411-6.

Weinberg RA, Hanahan D. The molecular pathogenesis of cancer. In: Bishop JM. **Molecular oncology**. New York: Scientific American;1996. p.179-204.

Whittaker JL, Walker RA, Varley JM. Differential expression of cellular oncogenes in benign and malignant human breast tissue. **Int J Cancer** 1986; 38:651-5.

Wilkinson S, Forrest APM. Fibro-adenoma of the breast. **Br J Surg** 1985; 72:838-40.

Winqvist R, Mannermaa A, Alavaikko M, Blanco G, Taskinen PJ, Kiviniemi H, Newsham I, Cavenee W. Refinement of regional loss of heterozygosity for chromosome 11p15.5 in human breast tumors. **Cancer Res** 1993; 53:4486-8.

Yokozaki H, Tahara E. Allele frequency of D17S855 microsatellite locus in Japanese people. **Hum Hered** 1999; 49:61-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Gnarr J, Linehan WM, Lubensky IA. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions < 1 mm in size. **Am J Pathol** 1995; 146:620-5.



BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. **Guia de apresentação de tese.** São Paulo: A Biblioteca, 1998.