

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE ADAM23
COMO UM NOVO MARCADOR MOLECULAR
DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE MAMA**

FELICIA PETERSON CAVALHER

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

Co-Orientadora: Dra. Giseli Klassen

São Paulo

2007

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

SEM SENTIDO, SEM PALAVRAS, SEM RAZÕES

Não sejas o hoje.
Não suspires por ontens...
não queiras ser o de amanhã.
Faze-te sem limites no tempo.
Vê a tua vida em todas as origens.
Em todas as existências.
Em todas as mortes.
E sabes que serás assim para sempre.
Não queiras marcar a tua passagem.
Ela prossegue:
É a passagem que se continua.
É a tua eternidade.
És tu.

Cecília Meireles, Cântico II

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Fernando,

por acreditar na ciência e vivê-la tão intensamente.

À minha mãe, Debora,

por me ensinar que a dedicação é a base de toda e qualquer conquista.

Ao meu irmão, Fernando Neto,

por me mostrar que muitos fenômenos da vida vão além da ciência.

Ao Fabrício,

por compartilhar comigo todos estes aprendizados e descobertas.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anamaria A. Camargo, pela oportunidade de pertencer a um grupo de pesquisa excepcional, em um laboratório muito bem equipado, que refletem a extrema eficiência com que conduz o Laboratório de Biologia Molecular e Genômica. Admiro muito sua dedicação e seu brilhantismo em todas as situações! Muito obrigada pelo convívio, pela disponibilidade, pela paciência e por tantos ensinamentos ao longo desses anos!

À Anna Christina Salim, pelo auxílio nos momentos de dúvidas, pela paciência nas horas difíceis, por compartilhar suas experiências, pelos conselhos... Obrigada por ser minha amiga, não só em assuntos profissionais, como também pessoais.

À Fabiana Bettoni, Lílían Pires, Daniel Vidal, Érico Costa, Maria Cristina Costa, Raphael Parmigiani e Fernando Camargo pela amizade, convivência, conversas durante o trabalho e pelos momentos de descontração.

A todos os componentes do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, Alex, Aline, Ana Paula, Andréia, Anna Chris, Camila, Daniela, Daniel, Érico, Fabi, Júlia, Lílían Inoue, Lílían Pires, Maria Cristina, Mônica, Murilo, Newton, Ricardo, Tamara e Valéria, pelo convívio diário, pelo ambiente de trabalho e por tudo o que aprendi com vocês.

À Valéria Paixão, pela ajuda com as amostras de tumores de mama e de plasma do Banco de Tumores, e pelo levantamento dos dados das pacientes a que correspondiam estas amostras. Obrigada também pelo auxílio em providenciar os materiais utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Mário Mourão Netto e à Dra. Maria do Socorro Maciel, do Departamento de Mastologia do Hospital A.C. Camargo, pelo apoio para a realização deste estudo.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, à Dra. Cynthia Toledo, à Dra. Isabela Cunha e ao Dr. Antônio Hugo Campos, médicos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, pela disponibilização e análise histopatológica das amostras de tumores de mama do Banco de Tumores e de linfonodos sentinelas.

Aos demais funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pela coleta das amostras de linfonodos sentinelas parafinizadas.

À Dra. Dirce Maria Carraro e à Louise Mota, do Laboratório de Análise de Expressão Gênica, pela ajuda com as amostras de tumores de mama do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo.

À Dra. Mariângela Corrêa, ao Dr. Daniel Gimenes e ao Dr. Vladimir Cláudio, médicos do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo, pelo levantamento dos dados clínico-patológicos das pacientes incluídas nos estudos com amostras de tumores de mama e plasma.

Ao Dr. André Carvalho, do Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital A.C. Camargo, pela realização das análises estatísticas envolvendo os dados clínico-patológicos das pacientes neste trabalho.

À Mariana Brait e Luciane Kagohara, do Laboratório de Genética do Câncer, pelo auxílio com a extração de DNA das amostras de plasma e linfonodos sentinelas parafinizados, respectivamente.

À Dra. Adriana Abalen, do Laboratório de Experimentação Animal, por permitir o uso do fluxo laminar durante a preparação das reações de MSP. Obrigada também a você, à Mariana Morato, à Juliana Real e à Graziela de seu laboratório pelo convívio e pelas conversas durante esses anos.

A todos os funcionários do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela boa convivência no ambiente de trabalho, pelo suporte técnico e administrativo.

À Ilma Profa. Dra. Luísa L. Villa, diretora do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela eficiente administração, por oferecer condições excelentes para a realização deste trabalho e pelas críticas e sugestões nos seminários do instituto.

À Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira, da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção e dedicação aos alunos.

À Suely Francisco, da biblioteca da Fundação Antônio Prudente, pelo auxílio na revisão e organização desta dissertação. Aos demais funcionários da biblioteca, obrigada pela disponibilidade na aquisição de artigos científicos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela avaliação dos relatórios científicos periódicos, pelo suporte financeiro e pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Dr. Irineu Velasco, por abrir as portas da ciência e despertar em mim o interesse inicial pela genética. Sua disponibilidade em me mostrar como eram as pesquisas em laboratórios de biologia molecular, às vésperas do vestibular, foram fundamentais para que eu decidisse seguir esta carreira.

Às minhas grandes amigas da faculdade, Ana Cintra, Anna Coló, Catú, Déa, Elisa, Maíra e Xanda, pelos anos de estudo e convivência na universidade, pelo apoio e interesse durante o mestrado, pelas conversas, fofocas, jantares, baladas, passeios e viagens durante e após a graduação. Obrigada por cultivarem nossa amizade dia após



dia, tornando nossos laços cada vez mais estreitos, e me dando a certeza de que encontrei amigas de verdade, para toda a vida. Adoro vocês!

À Talita, minha amiga mais antiga, que me acompanha desde os 3 anos de idade! Às vezes mais perto, às vezes mais longe, nossa amizade está sempre presente no meu coração! Obrigada por participar da minha vida como uma irmã! Seu apoio e seu carinho foram e sempre serão muito importantes pra mim!!!

Aos meus avós, Arthur, Tina, Fernando e Marise, Décio e Edyla, Ivan e Maria Antônia, pelo carinho e atenção que sempre dedicaram a mim.

À minha família paulistana, Sra. Maria de Lourdes, Sr. Antônio, Fernanda, Flávia, Francine e Fabrício, pelos abraços, pelo carinho, pela atenção, pelo apoio em todos os momentos, por fazerem eu me sentir como uma filha adotada muito amada em sua casa! Vocês foram fundamentais nesta etapa da minha vida!

Ao Neneto que, muito mais que um irmão, sempre foi um amigo verdadeiro e maravilhoso. Obrigada pelos seus conselhos, pela sua participação em minha vida, por me mostrar um lado diferente do mundo e , sobretudo, pelo seu amor!

Aos meu pais, Debora e Fernando, por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo em todos os momentos, pelos ensinamentos ao longo da vida, pela sua amizade e, principalmente, pelo amor incondicional! Sua preocupação e dedicação como pais e amigos são um grande exemplo para mim!!!

Ao Fabrício, meu querido, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, pela compreensão, pelos momentos extraordinários e inesquecíveis que foram tão importantes durante estes anos! Seu imenso amor foi essencial para que eu chegasse até aqui! Muito obrigada por tudo!!!

RESUMO

Cavallher FP. **Caracterização do gene ADAM23 como um novo marcador molecular de prognóstico em câncer de mama.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de mama é o principal tipo de câncer responsável por óbitos entre as mulheres brasileiras, a maior parte deles em consequência de metástases. O prognóstico de pacientes com câncer de mama é estimado principalmente na presença de metástases em linfonodos axilares e no tamanho do tumor. Entretanto, cerca de 30% das pacientes com linfonodos negativos morrem em decorrência da doença, evidenciando a necessidade de marcadores moleculares mais sensíveis e específicos capazes de prever com maior precisão a evolução da doença e o esquema terapêutico a ser seguido. O gene ADAM23 encontra-se frequentemente silenciado por hipermetilação de sua região promotora em linhagens tumorais metastáticas e tumores primários de mama em estágios mais avançados. Neste trabalho, avaliamos o padrão de metilação da ilha de CpG localizada próxima ao sítio de início de transcrição do gene ADAM23 (região 2) em 94 amostras de tumores de mama previamente analisadas em nosso laboratório para a presença de hipermetilação em uma ilha de CpG localizada de -1025pb a -549pb do sítio de início da transcrição (região 1). A presença de hipermetilação na região 2 foi detectada em 14 das 94 (14.9%) amostras e foi associada significativamente ao tamanho do tumor, ao número de linfonodos comprometidos por metástases e à superexpressão da proteína p53. Pacientes com hipermetilação na região 2 tiveram sobrevida livre de metástase à distância (SLMD) e sobrevida global específica (SGE) em 5 anos significativamente menores do que as que não apresentaram ADAM23 hipermetilada (57.1 versus 85.7%, $p<0.018$, e 71.4% e 92.3%, $p=0.037$, respectivamente). A hipermetilação da região 2 também se revelou um fator de prognóstico independente para a SLMD e SGE. Uma análise estatística combinada mostrou que a presença de hipermetilação nas duas regiões do promotor da ADAM23 tem maior valor prognóstico quando comparada à presença de metilação

em apenas uma região ou em nenhuma das duas regiões (37.5% versus 74.1% versus 91.0%, $p < 0.001$ para SLMD e 50.0% versus 92.4% versus 93.1%, $p < 0.001$ para SGE). A hipermetilação na duas regiões da ADAM23 também se revelou um fator de prognóstico independente para SLMD (HR 8.84, IC 95%, 2.31-33.76, $p = 0.001$) e SGE (HR 9.97, IC 95%, 1.96-50.61, $p = 0.006$). Para avaliar o valor prognóstico da detecção de hipermetilação no gene ADAM23 em plasma de pacientes com câncer de mama nós analisamos 37 amostras de plasmas de pacientes cujo tumor primário apresentava hipermetilação em ADAM23. A presença de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 foi observada em 51.4% (19/37) das amostras. Entretanto, a análise de sobrevida não mostrou diferença significativa entre as taxas de SLMD e SGE das pacientes que apresentaram ADAM23 hipermetilada no plasma e as pacientes que não apresentaram. Por fim, analisamos o perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor da ADAM23 em linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama a fim de avaliar sua utilização como uma ferramenta molecular para detecção de células metastáticas em linfonodos sentinela. A presença de hipermetilação na região 1 da ADAM23 foi verificada nos linfonodos sentinelas de 86.9% (20/23) das pacientes sem linfonodos comprometidos, segundo a análise histo-patológica, e cujo tumor primário apresentava ADAM23 hipermetilada, sugerindo a presença de células metastáticas não detectadas pela análise histo-patológica convencional. Entretanto, não detectamos hipermetilação na região 2 em linfonodos de nenhuma das 8 pacientes que, além da região 1, apresentaram hipermetilação da ADAM23 na região 2 nos tumores primários de mama. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que a presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 em tumores primários de mama pode ser utilizada como marcador molecular de prognóstico em pacientes com câncer de mama. Além disso, a presença de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 também pode ser utilizada para detectar células tumorais metastáticas em linfonodos de pacientes com tumor de mama, oferecendo um método mais sensível e específico para a detecção de metástases linfonodais quando comparado à análise histo-patológica convencional.

SUMMARY

Cavalher FP. [Characterization of ADAM23 gene as a new prognostic molecular marker in breast cancer]. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Breast cancer is the major type of cancer responsible for deaths in Brazilian women, most of them as a consequence of metastasis. Prognosis of breast tumor patients is mainly estimated by the presence of metastatic cells in the axillary lymph nodes and tumor size. However, about 30% of patients with negative lymph nodes die because of the disease, highlighting the need for more sensitive and specific molecular markers capable of accurately predicting the evolution of the disease and the therapeutic scheme to be followed. The ADAM23 gene is frequently silenced by promoter hypermethylation in metastatic tumor cell lines and primary breast tumors in more advanced stages. In this work, we evaluated the methylation pattern of the CpG island located near the transcription start site of the ADAM23 gene (region 2) in 94 breast tumor samples previously analyzed in our laboratory for the presence of hypermethylation in another CpG island located at -1025 to -549 bp in relation to the transcription start site (region 1). The presence of hypermethylation in region 2 was detected in 14 out of 94 (14.9%) samples and was significantly associated with tumor size, number of positive lymph nodes and p53 protein over expression. Patients with hypermethylation in region 2 had a shorter distant metastasis free survival (DMFS) and disease specific survival (DSS) in 5 years than those that didn't show ADAM23 hypermethylated (57.1 versus 85.7%, $p<0.018$, and 71.4% e 92.3%, $p=0.037$, respectively). Hypermethylation in region 2 was also found to be an independent prognostic factor for DMFS and DSS. A combined statistic analysis showed that the presence of hypermethylation in both regions of ADAM23 promoter have a greater prognostic value when compared to presence of methylation in one of the two regions or in none of them (37.5% versus 74.1% versus 91.0%, $p<0.001$ for DMFS and 50.0% versus 92.4% versus 93.1%, $p<0.001$ for GSS). Hypermethylation in both regions of ADAM23 also revealed to be an independent prognostic factor for DMFS

Fundação Antônio Prudente
Ala Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

(HR 8.84, IC 95%, 2.31-33.76, $p=0.001$) and DSS (HR 9.97, IC 95%, 1.96-50.61, $p=0.006$). To evaluate the prognostic value of detecting ADAM23 hypermethylation in the plasma of breast cancer patients we analyzed 37 plasma samples from patients harboring primary tumors with ADAM23 hypermethylation. The presence of ADAM23 promoter hypermethylation was observed in 51.4% (19/37) of samples. However, survival analysis didn't show a significant difference between DMFS and DSS rates from patients that presented ADAM23 hypermethylation in plasma and those that did not. Finally, we analyzed the methylation pattern of ADAM23 promoter regions 1 and 2 in sentinel lymph nodes of breast cancer patients in order to evaluate its use as a molecular tool to detect metastatic cells in sentinel lymph nodes. The presence of hypermethylation in region 1 of ADAM23 was verified in the sentinel lymph nodes of 86.9% (20/23) of the patients with negative lymph nodes, according to the histo-pathological analysis, and in whose primary tumors ADAM23 was hypermethylated, suggesting the presence of metastatic cells not detected by the conventional histo-pathological analysis. However, we didn't detect hypermethylation in region 2 in the sentinel lymph nodes of neither 8 patients that, besides region 1, showed hypermethylation of ADAM23 in region 2 in primary breast tumors. Together, these results show that the presence of hypermethylation in the promoter region of ADAM23 gene in breast primary tumors can be used as a prognostic molecular marker in breast cancer patients. Besides, the presence of hypermethylation in the promoter region of ADAM23 gene can also be used to detect metastatic tumor cells in sentinel lymph nodes of breast cancer patients, offering a more sensitive and specific method to detect lymph nodes metastasis as compared to conventional histo-pathological analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A metilação do DNA em uma ilha de CpG localizada na região promotora de um gene e o silenciamento gênico.	17
Figura 2	Representação esquemática de uma proteína da família ADAM e seus domínios característicos.	28
Figura 3	Representação esquemática das ilhas CpGs localizadas na região promotora do gene ADAM23.	31
Figura 4	Representação esquemática das duas regiões correspondentes às ilhas de CpGs da região promotora do gene ADAM23, demonstrando a localização dos fragmentos de cada região analisados por MSP.	53
Figura 5	Avaliação do perfil de metilação da ilha CpG localizada na região 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama.	60
Figura 6	Curvas de sobrevida em 5 anos das pacientes com câncer de mama, em relação ao perfil de metilação das duas regiões no promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama.	68
Figura 7	Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama.	72
Figura 8	Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em amostras de plasma de mulheres saudáveis e de pacientes com câncer de mama sem ADAM23 metilada no tumor primário.	72
Figura 9	Curvas de sobrevida em 5 anos, em relação ao perfil de metilação da ADAM23 em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama.	74
Figura 10	Teste da sensibilidade do MSP para as regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23.	79

Figura 11 Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em amostras de linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama.

83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.	61
Tabela 2	Associação entre a presença de hipermetilação nas ilhas de CpGs 1 e 2 da região promotora do gene ADAM23 e as variáveis clínico-patológicas das pacientes.	63
Tabela 3	Análise univariada de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica.	65
Tabela 4	Análise multivariada para risco de desenvolvimento de metástases à distância e risco de óbito decorrente de câncer de mama em 5 anos.	69
Tabela 5	Variáveis clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.	73
Tabela 6	Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N0.	77
Tabela 7	Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N1.	78
Tabela 8	Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N1.	80
Tabela 9	Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N0.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACS	do inglês <i>American Cancer Society</i>
ADAM	do inglês <i>A Desintegrin And Metalloprotease</i>
AgNO₃	Nitrato de Prata
AJCC	do inglês <i>The American Joint Committee on Cancer</i>
APS	Persulfato de Amônio
C₆H₆O₂	Hidroquinona
cDNA	DNA complementar
CMF	drogas quimioterápicas ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoracil
CpG	do inglês <i>Cytosine phosphate Guanine</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DNTPs	Deoxinucleotídeos fosfato
ECAD	do inglês <i>Epithelial cadherin</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER	do inglês <i>Estrogen Receptor</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAC	drogas quimioterápicas 5-fluoracil, adriamicina e ciclofosfamida
FEC	drogas quimioterápicas 5-fluoracil, epirrubicina e ciclofosfamida
FT	Fator de transcrição
H&E	coloração hematoxilina-eosina
HAT	Histona Acetil Transferase
HCL	Ácido clorídrico
HDAC	Histona Deacetilase
HMT	Histona Metil Transferase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kb	Kilobase

LINE	do inglês <i>Long Interspersed Element</i>
M	Molar
MBPs	do inglês <i>Methyl-CpG Binding Proteins</i>
MDC	do inglês <i>Metalloprotease-like Disintegrin-like Cystein-rich</i>
mg	miligramas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteases de Matriz
mRNA	RNA mensageiro
MSP	do inglês <i>Methylation Specific PCR</i>
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHSO₃	Bissulfito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
NH₄OAc	Acetato de amônio
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PCR	do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	do inglês <i>Progesterone Receptor</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	do inglês <i>Reverse Transcriptase PCR</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SBR	Sistema de Bloom & Richardson
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINE	do inglês <i>Short Interspersed Element</i>
SVMPs	do inglês <i>Snake Venom Metalloproteases</i>
TNM	do inglês <i>Tumor Node Metastasis</i>

TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
UICC	do francês <i>Union Internationale Contre le Cancer</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	O Câncer de Mama	2
1.1.1	Epidemiologia	2
1.1.2	Diagnóstico e Tratamento	4
1.2	Fatores prognósticos em câncer de mama e o envolvimento de linfonodos axilares	6
1.3	Marcadores moleculares de prognóstico em câncer de mama e a detecção de células tumorais em linfonodos	10
1.4	A metilação do DNA e a regulação da expressão gênica	13
1.5	A metilação do DNA e o câncer	18
1.6	A metilação do DNA como marcador molecular em câncer de mama	20
1.7	A detecção da metilação do DNA em fluidos corpóreos de pacientes diagnosticados com câncer de mama	22
1.8	A detecção da metilação do DNA em linfonodos de pacientes com câncer de mama	25
1.9	A Família ADAM	26
1.10	ADAM23	29
1.11	ADAM23 e o câncer de mama	30
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Material Biológico	38
3.1.1	Amostras de tumores primários	38
3.1.2	Amostras de plasmas	38
3.1.3	Amostras de linfonodos sentinela	39
3.1.4	Amostras de linfócitos normais	42

3.2	Extração de DNA	42
3.2.1	Extração de DNA de tumores primários	42
3.2.2	Extração de DNA de plasma	43
3.2.3	Extração de DNA de linfonodos sentinelas	44
3.2.4	Extração de DNA de linfócitos	45
3.3	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	46
3.4	Análise de metilação por MSP	48
3.5	Metilação de DNA de linfócitos <i>in vitro</i>	55
3.6	Correlação do perfil de metilação do gene ADAM23 com os dados clínico-patológicos das pacientes	55
4	RESULTADOS	59
4.1	Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em tumores primários de mama e correlação com dados clínico-patológicos das pacientes	59
4.2	Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em plasma de pacientes com câncer de mama	70
4.3	Avaliação do perfil de metilação do promotor do gene ADAM23 em linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama.	75
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	101
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama possui uma alta incidência em todo o mundo, sendo o tipo mais freqüente de câncer dentre as mulheres ocidentais. Nos Estados Unidos, estima-se a identificação de 678.060 novos casos de câncer para o ano de 2007, sendo que 26% (178.480) correspondem a tumores invasivos de mama. Neste ano também são estimadas aproximadamente 40.460 mortes decorrentes de câncer de mama nos EUA, o que representa 15% de todos os óbitos por câncer e o segundo tipo de câncer que mais provoca mortes, atrás apenas do câncer de pulmão. Entre as mulheres americanas, a probabilidade de desenvolver câncer de mama em algum momento da vida é de 1 em cada 8 mulheres (13%) e o risco de óbito decorrente deste tipo de tumor é de 1 em cada 33 (3%) mulheres (JEMAL et al. 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde estimou para o ano de 2006 a identificação de aproximadamente 48.930 novos casos de câncer de mama, o que representa o surgimento de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2005). No Brasil, o câncer de mama constitui a terceira maior causa de mortes, sendo a segunda no sexo feminino e o principal tipo de câncer responsável por óbitos entre as mulheres. Em 2003, foram registrados 9.335 óbitos decorrentes da doença na população feminina brasileira (Ministério da Saúde 2003).

A metástase representa a principal causa de morte para pacientes com câncer de mama. Aproximadamente 10 a 15% das pacientes com tumor de mama apresentam doenças agressivas que recidivam em até 3 anos após o diagnóstico inicial da doença. Entretanto, não é incomum o aparecimento de metástases em sítios distantes 10 ou mais anos após a identificação do tumor primário (STEEG 2004). Os sítios mais comuns de formação de metástases são ossos, pulmão e fígado (LEE 1983).

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS), quando diagnosticado em estádios iniciais, o câncer de mama pode ser tratado com cirurgia conservadora e as taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos para pacientes com doença local e sem envolvimento metastático dos linfonodos axilares são superiores a 95%. Em caso de espalhamento regional da doença, as taxas de sobrevida diminuem para 83%. Entretanto, quando há presença de metástases em outros órgãos, as taxas de sobrevida diminuem drasticamente, reduzindo-se a aproximadamente 26% (JEMAL et al. 2007).

Após a década de 80, a implementação de métodos de diagnóstico precoce, principalmente a realização de mamografias periódicas e de tratamentos adjuvantes com quimioterápicos, ocasionou um declínio considerável das taxas de recidiva da doença e de mortalidade associadas à doença na população americana. Entretanto, as taxas de incidência permaneceram em crescimento contínuo até 2001, estabilizando-se a partir desta data, o que reflete a maior acessibilidade aos serviços de saúde e a possibilidade de diagnóstico de tumores em estádios iniciais.

Assim como outros tipos de tumores, as causas do câncer de mama não são conhecidas. Muitos fatores endógenos e exógenos parecem aumentar a

susceptibilidade à doença. Dentre os fatores de risco podemos citar idade avançada, história familiar, predisposição genética, menarca precoce (antes de 12 anos), menopausa tardia (após 55 anos), nuliparidade, gravidez em idade avançada (após 30 anos), uso de contraceptivos orais, adoção de terapia hormonal durante a menopausa, tipo de dieta, obesidade após a menopausa, sedentarismo, consumo de álcool e fumo.

O tipo histológico mais freqüente dentre os tumores malignos da mama é o carcinoma que tem origem a partir das células epiteliais que revestem os ductos e os lóbulos da glândula mamária. Os carcinomas podem se apresentar sobre a forma *in situ* ou invasiva. Os carcinomas invasivos representam de 70 a 80% de todos os tumores de mama identificados, sendo que destes cerca de 80% correspondem a carcinomas ductais invasivos, 10% a carcinomas lobulares invasivos e o restante a outros subtipos, como carcinomas tubulares, mucinosos, medulares, entre outros (TAVASSOÉLI e DEVILEE 2003).

1.1.2 Diagnóstico e Tratamento

Entre os principais métodos de detecção precoce do câncer de mama incluem-se o auto-exame, o exame clínico palpatório e a mamografia. Atualmente, a ultrasonografia e a ressonância magnética também têm sido empregadas como métodos de diagnóstico complementares à mamografia, indicados para pacientes mais jovens (abaixo de 35 anos) ou que possuem história familiar da doença, respectivamente. A sensibilidade destes métodos varia entre 46% e 88%, e sua especificidade varia entre 82% e 99%, e são influenciadas por fatores como tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário, qualidade dos recursos técnicos e habilidade e interpretação dos profissionais (COELHO e MAKDISSI 2006; JEMAL et al. 2007).

Após a detecção de uma massa sólida na mama, o paciente é submetido a biópsia e avaliação anátomo-patológica, a fim de confirmar o diagnóstico. Uma vez confirmada a ocorrência de carcinoma de mama, exames complementares são realizados para se determinar o estadiamento clínico da doença o qual, por sua vez, definirá a conduta terapêutica a ser seguida. Exames complementares incluem o raio-X de tórax, a cintilografia óssea e a tomografia computadorizada e são geralmente realizados para avaliar a presença de doença metastática (VANPOZNAK e SEIDMAN 2002).

O sistema de classificação mais frequentemente utilizado para o estadiamento do câncer de mama é o TNM, criado pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) e pelo UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). Esse sistema se baseia especificamente no tamanho do tumor (T), no acometimento de linfonodos (N) e na presença de metástases à distância (M) (STYBLO e WOOD 1998; SOBIN e WITTEKIND 2004).

O tratamento do câncer de mama baseia-se em terapias locais, sistêmicas e biológicas. Inicialmente, realiza-se a ressecção cirúrgica conservadora com remoção das margens do tumor ou, em casos mais avançados, a mastectomia radical, sempre acompanhadas pela remoção de linfonodos axilares. Logo em seguida, a radioterapia local pode ser indicada a fim de remover células cancerosas remanescentes na mama.

O tratamento adjuvante geralmente é indicado para pacientes que possuem tumores maiores que 1 cm ou com metástases em linfonodos axilares. A terapia adjuvante sistêmica baseia-se na quimioterapia e na hormonioterapia. Na primeira modalidade, diferentes combinações de esquemas quimioterápicos podem ser adotadas, empregando-se antracíclicos (doxorubicina ou adriamicina e epirubicina)

e taxanos (paclitaxel e docetaxel). As combinações mais freqüentemente empregadas são: FAC (combinação das drogas 5-fluoracil, adriamicina e ciclofosfamida), CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoracil) e FEC (5-fluoracil, epirrubicina e ciclofosfamida), que podem ou não ser seguidas do uso de taxanos. A escolha do esquema terapêutico depende das características de cada paciente e da experiência do oncologista.

No caso da hormonioterapia, o tamoxifeno é o mais comumente empregado, sendo indicado para pacientes com tumores de mama positivos para os receptores hormonais de estrógeno e progesterona. Em alguns casos, também pode ser indicado o uso de inibidores de aromatase.

Recentemente, a terapia biológica utilizando o anticorpo monoclonal Trastuzumabe (Herceptina[®]), que reconhece o domínio extracelular da proteína HER-2/neu, produto do oncogene c-erbB2, tem sido indicada para pacientes com tumores de mama que apresentam superexpressão de c-erbB2, o que é verificado em cerca de 15 a 30% dos casos. Estes tumores geralmente são muito agressivos e estão associados a altas taxas de recidivas (SLAMON et al. 1987, 2001).

1.2 FATORES PROGNÓSTICOS EM CÂNCER DE MAMA E O ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS AXILARES

Os principais fatores prognósticos para o câncer de mama são a presença de metástases em linfonodos axilares e o tamanho do tumor. Além destes, outros fatores também são empregados, como o grau histológico, a presença de invasão linfática e/ou vascular, a expressão dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona e a

superexpressão do oncogene c-erbB2. Entretanto, cerca de 30% das pacientes que não apresentam comprometimento linfonodal morrem em decorrência da doença, provavelmente por possuírem células metastáticas não detectadas ao diagnóstico (FISHER e GEBHARDT 1978). Teoricamente, essas pacientes se beneficiariam da administração de terapia adjuvante; contudo não é possível, até o momento, identificá-las. Por outro lado, a adoção de terapia adjuvante em todas as pacientes submetidas a ressecção cirúrgica é inviável, devido à alta toxicidade do tratamento e ao seu elevado custo (THOMSEN et al. 2003). Estima-se também que cerca de 30 a 40% das pacientes com tumor de mama e que possuem linfonodos acometidos por metástases permaneceriam livres de recidiva da doença em 10 anos e não necessitariam receber terapia adjuvante (HELLMAN 1994). Estes dados evidenciam a importância da identificação de marcadores moleculares de prognóstico mais sensíveis e específicos, capazes de identificar os grupos de baixo e alto risco para o desenvolvimento de metástases, prever com maior acuidade sua evolução clínica e apontar as pacientes que realmente se beneficiariam da adoção do tratamento adjuvante sistêmico.

A análise histo-patológica dos linfonodos axilares é realizada logo após sua remoção da axila das pacientes, durante a cirurgia da mama. Inicialmente, o tecido linfonodal é examinado manualmente por palpação cuidadosa. Os linfonodos são isolados e aparecem macroscopicamente como nódulos de coloração parda ou pardo-amarelada quando livres de metástases, ou esbranquiçados e endurecidos quando na presença de células metastáticas. Em seguida, são enviados para avaliação microscópica. Para o exame histo-patológico dos linfonodos axilares é empregado o bi-seccionamento. A detecção de células tumorais é realizada mediante coloração dos

cortes histológicos com hematoxilina-eosina (H&E), seguida por imunoistoquímica com marcadores de células epiteliais (citoceratinas) nos casos em que não foram detectadas metástases pela coloração com hematoxilina-eosina.

A análise histo-patológica de linfonodos axilares é uma técnica que apresenta muitas limitações. Além de ser extremamente trabalhosa e de consumir muito tempo dos patologistas, a remoção dos linfonodos da axila das pacientes traz muitas seqüelas, como danos à circulação sangüínea e linfática local e inchaços nos braços e nas axilas, e está associada a uma alta taxa de morbidade (AARSVOLD e ALAZRAKI 2005). Além disso, devido ao grande número de linfonodos axilares removidos, o que pode variar de 10 a 30 nódulos, não é possível analisar um número razoável de cortes histológicos de cada um individualmente, o que impede uma análise minuciosa e diminui a sensibilidade do exame. Conseqüentemente, ocorrem muitos resultados falso-negativos, o que poderia explicar a recidiva da doença em aproximadamente 30% das pacientes com câncer de mama sem comprometimento linfonodal (FISHER e GEBHARDT 1978).

Atualmente, um método alternativo à tradicional dissecação de linfonodos axilares tem sido empregado para determinação do status linfonodal em pacientes diagnosticadas com tumor de mama. Trata-se da biópsia de linfonodos sentinela. O termo linfonodo sentinela foi inicialmente proposto pelo urologista CABANAS, em 1977, para designar o primeiro nódulo de uma região linfática que recebe drenagem de um sítio específico do tumor e, portanto, constitui o local mais provável de abrigo de células tumorais, caso elas tenham invadido os vasos linfáticos. A biópsia de linfonodo sentinela foi popularizada no final da década de 80 e início dos anos 90 por MORTON et al. (1991) em melanoma. Alguns anos depois, esta técnica passou a ser

adotada também para câncer de mama, sendo amplamente empregada a partir do início do século XXI (AARSVOLD e ALAZRAKI 2005).

A biópsia de linfonodo sentinela pode ser feita de duas maneiras. No primeiro método, injeta-se um corante azul isossulfano que identifica vasos e nódulos linfáticos e permite a excisão e a avaliação dos nódulos corados. Na segunda técnica, os linfonodos são identificados por um marcador radioativo (colóide sulfuroso marcado com tecnécio-99m, Tc-99m) e, através de sua detecção por uma sonda de captação de partículas gama, o cirurgião é capaz de localizá-los e removê-los. Geralmente, as duas técnicas são empregadas de modo complementar, o que aumenta a eficiência e a precisão da detecção (AARSVOLD e ALAZRAKI 2005).

A biópsia de linfonodos sentinela é um método confiável de determinação do status do linfonodo axilar (Krag et al. 1993; ALBERTINI et al. 1996; GIULIANO et al. 1997; BARNWELL et al. 1998). Dentre as vantagens desta técnica está a análise de uma menor quantidade de linfonodos, pois geralmente são removidos apenas 1, 2, às vezes 3 e raramente 4 nódulos. Além disso, a remoção de uma menor porção tecidual axilar traz menos seqüelas às pacientes e diminui as taxas de morbidade associadas à doença. Após sua remoção, os linfonodos são submetidos ao seccionamento múltiplo, seguido por coloração com hematoxilina-eosina e imunoistoquímica, o que representa uma análise muito mais acurada e confiável do que a bi-seção adotada na prática tradicional de análise de linfonodos axilares. Sua maior precisão permite a identificação de pacientes com micrometástases, geralmente não identificadas pelo método tradicional (CHU et al. 1999; REYNOLDS et al. 1999).

Micrometástases são definidas pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) como acúmulos de células tumorais metastáticas maiores do que 0.2 mm e menores do que 2.0 mm de diâmetro, enquanto agrupamentos de células tumorais menores ou iguais a 0.2 mm de diâmetro são referidos como células isoladas de tumor (FLEMING et al. 1997). É importante ressaltar que o significado clínico da presença de micrometástases e de células isoladas de tumor em linfonodos axilares permanece controverso, apesar de alguns estudos em larga escala sugerirem que a presença de micrometástases linfonodais está associada a pior prognóstico e diminui a sobrevida livre de doença e a sobrevida global de pacientes com câncer de mama (Anonymus 1990; COTE et al. 1999; YOSHIHISA et al. 2002). Em relação às células isoladas de tumor, seu valor prognóstico não foi comprovado até o momento.

1.3 MARCADORES MOLECULARES DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE MAMA E A DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM LINFONODOS

Nos últimos anos, intensificou-se a busca de novos marcadores moleculares mais sensíveis e específicos, capazes de predizer a evolução clínica das pacientes com tumores de mama (marcadores de prognóstico), assim como detectar células tumorais de mama diretamente no tecido linfonodal.

Alguns estudos têm procurado identificar alterações no padrão de expressão de grupos de genes no tumor primário capazes de predizer a evolução da doença (VAN'T VEER et al. 2002; VAN DE VIJVER et al. 2002; WANG et al. 2005). Nestes trabalhos, utilizando plataformas de *microarray*, foram identificadas

assinaturas gênicas de pior ou melhor prognóstico em tumores de mama que se revelaram significativamente associadas com a sobrevida livre de metástases em 5 anos das pacientes, sendo capazes de prever corretamente as pacientes com maior chance de desenvolver metástases.

Da mesma forma, metodologias alternativas e mais sensíveis do que as tradicionais análises histo-patológicas têm sido avaliadas para detectar células metastáticas em linfonodos sentinelas. Essas metodologias são baseadas na detecção por RT-PCR de transcritos específicos de células epiteliais nos linfonodos removidos. Apesar de muitos estudos demonstrarem maior eficiência deste método em relação à tradicional avaliação histo-patológica para detecção principalmente de micrometástases e de células tumorais isoladas, sua sensibilidade e especificidade também são limitadas, visto que os tumores apresentam expressão heterogênea desses transcritos, e em alguns casos é possível detectar níveis basais dos mesmos em linfonodos normais.

A fim de se contornar estas limitações, muitos estudos têm utilizado a detecção simultânea de mais de um transcrito específico de células epiteliais no tecido linfonodal através de RT-PCR em tempo real. WEIGELT et al. (2004) empregaram essa estratégia com o objetivo de identificar a presença de micrometástases em linfonodos sentinelas livres de metástases, de acordo com a avaliação histo-patológica convencional, de pacientes com câncer de mama. Inicialmente, foram testados diversos genes candidatos quanto à sua especificidade em linfonodos de pacientes com tumor de mama. Após a escolha de quatro genes, citoceratina 19 (CK19), fator trefoil-3 (p1B), glicoproteína epitelial-2 (EGP2) e mucina epitelial pequena de mama (SBEM), este painel foi utilizado para avaliar a

presença de células tumorais em 70 linfonodos sentinelas não comprometidos por metástases, segundo a análise histo-patológica convencional. Observou-se alta expressão destes genes em sete linfonodos (10%), sugerindo a presença de micrometástases. Após uma re-avaliação minuciosa das lâminas empregadas na análise histo-patológica, quatro dos sete linfonodos positivos por RT-PCR em tempo real revelaram a presença de células tumorais. Portanto, a técnica de RT-PCR em tempo real revelou-se mais sensível do que a análise histo-patológica convencional em 10% das amostras.

Apesar de ter se revelado um método de alta sensibilidade e especificidade, a avaliação da expressão de transcritos específicos de células epiteliais no tecido linfonodal através de RT-PCR em tempo real é uma estratégia difícil de ser aplicada na rotina clínica devido à manipulação da molécula de RNA. O RNA é uma molécula extremamente sensível e, por isso, de baixa estabilidade, o que dificulta sua manipulação. A molécula de DNA, ao contrário do RNA, é bastante estável e de fácil manipulação. Sendo assim, alterações que ocorram na molécula de DNA e que sejam específicas da célula tumoral como, por exemplo, alterações no padrão de metilação da molécula de DNA, podem ser mais facilmente detectadas e seriam mais apropriadas para a implantação na prática clínica.

1.4 A METILAÇÃO DO DNA E A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A metilação do DNA é uma característica dos genomas eucariotos. Em mamíferos, apenas citosinas localizadas a 5' de guaninas, em dinucleotídeos CpGs, podem ser metiladas (BIRD 2002). A adição de um grupo metil ao carbono 5 de uma citosina é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Estima-se que em células somáticas humanas as citosinas metiladas correspondam a aproximadamente 1% do total de bases do DNA e que, portanto, cerca de 70 a 80% dos dinucleotídeos CpGs estejam metilados no genoma humano (EHRlich 1982).

Os dinucleotídeos CpGs possuem uma baixa representação no genoma humano, e isto se deve à alta taxa de mutações associadas às metilcitosinas, que podem sofrer deaminação hidrolítica espontânea e serem convertidas em timinas durante a replicação do DNA (COULOUNDRÉ et al. 1978). Sua distribuição no genoma não é randômica, sendo que a maior parte destes dinucleotídeos está concentrada em regiões ricas em CpGs denominadas ilhas de CpGs.

As ilhas de CpGs são definidas como seqüências de DNA de tamanho superior a 200 pares de bases, cujo conteúdo de guaninas e citosinas é igual ou superior a 50%, e que apresentam uma razão entre a frequência observada e a frequência esperada de dinucleotídeos CpGs igual ou superior a 0,6 (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987). As ilhas de CpGs são encontradas em locais próximos aos promotores dos genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras dos genes de expressão tecido específica (MCCLELLAND e IVARIE 1982). Inicialmente, acreditava-se que em células normais a maioria das ilhas de

CpGs não estava metilada, independente do estado de ativação dos genes a que estavam relacionadas, exceto por aquelas associadas ao *imprinting* genômico e à inativação do cromossomo X. Entretanto, muitos trabalhos recentes identificaram a presença de inúmeras ilhas de CpGs metiladas em células somáticas normais (STRICHMAN-ALMASHANU et al. 2002; SONG et al. 2005). Contudo, a maior parte dos dinucleotídeos CpGs metilados estão dispostos fora das ilhas, principalmente em regiões repetitivas do genoma, incluindo seqüências satélites de DNA, LINES (do inglês *Long Interspersed Elements*), SINES (do inglês *Short Interspersed Elements*) e retrovírus endógenos (YODER et al. 1997).

Inúmeros estudos demonstram que a presença de metilação em regiões regulatórias do genoma está associada com a diminuição da transcrição ou silenciamento gênico. A metilação do DNA, juntamente com a modificação de histonas e o *imprinting* genômico, são os principais mecanismos epigenéticos, capazes de alterar o padrão de expressão gênica sem afetar a seqüência de nucleotídeos do DNA (JONES e BAYLIN 2002; LAIRD 2003).

Muitos mecanismos parecem estar envolvidos no silenciamento gênico por metilação. Um destes mecanismos consiste no bloqueio da ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação ao DNA (TATE e BIRD 1993). Membros da família das proteínas de ligação a CpGs metilados (do inglês *Methyl-CpG binding proteins*), como MeCP2, MBD1-MBD4, também possuem um papel importante neste processo, pois funcionam como repressores da transcrição (BOYES e BIRD 1991), se associam a vários complexos de remodelamento da cromatina, e atraem histonas deacetilases (HDACs) para regiões de silenciamento gênico, promovendo a compactação da cromatina (JONES et al. 1998; NG et al. 1999; WADE et al. 1999).

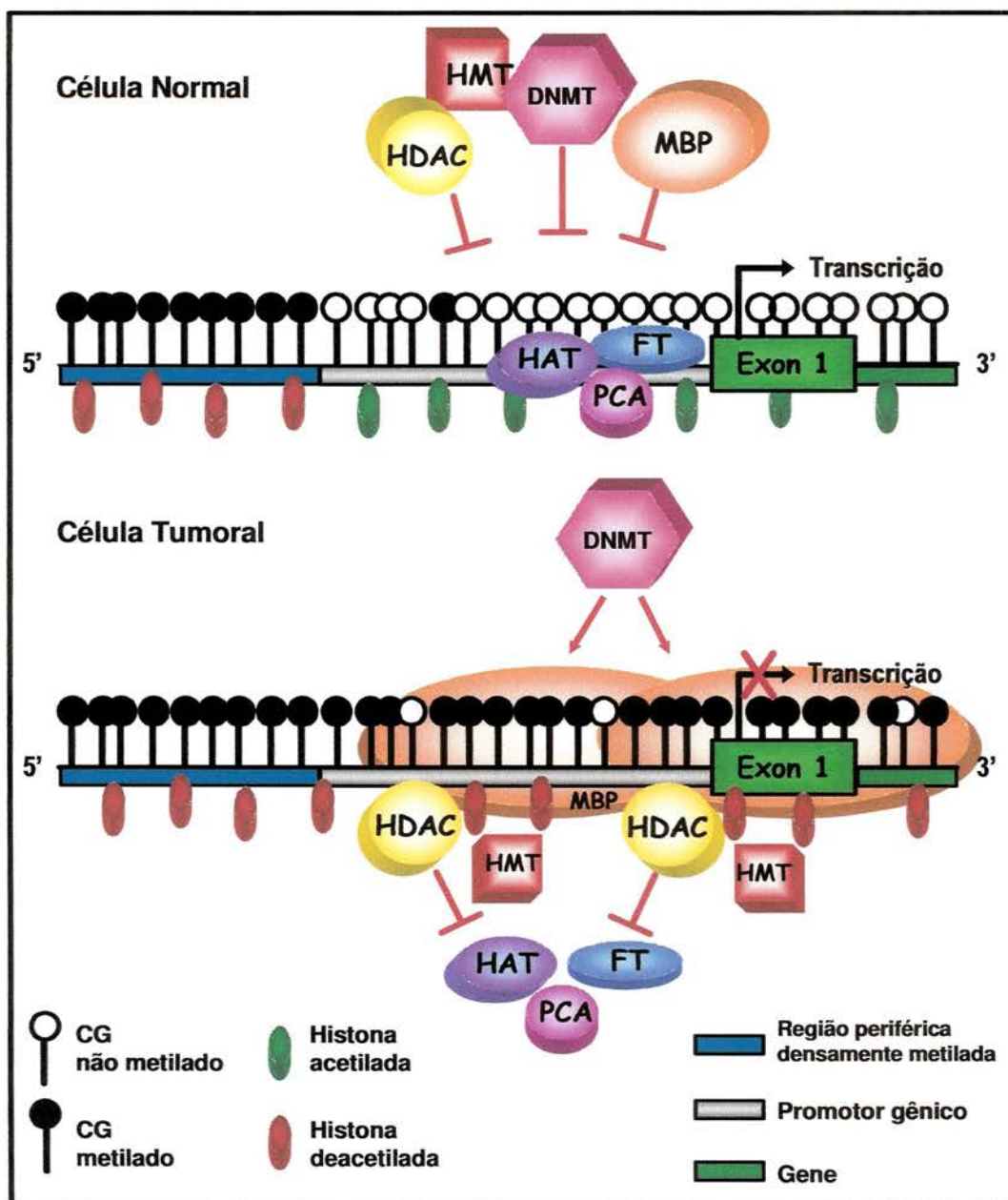
Recentemente, novas proteínas que participam deste processo têm sido identificadas, como CTCF (do inglês *CCCTC-binding factor*) (LOBANENKOV et al. 1986; BELL et al. 1999) e BORIS ou CTCFL (do inglês *CCCTC-binding factor-like*) (LOUKINOV et al. 2002; KLENOVA et al. 2002).

Em células de mamíferos, a repressão transcricional está associada à ocorrência de um promotor densamente metilado e à cromatina em conformação compactada, ocasionada pela presença de histonas deacetiladas e metiladas em resíduos específicos, o que impede o acoplamento do complexo de ativação da transcrição à fita de DNA (Figura 1). Entretanto, até o momento não está claro qual a ordem em que estes processos ocorrem e qual deles é o responsável por desencadear o silenciamento gênico e atrair outras moléculas necessárias ao seu estabelecimento.

Como mencionado anteriormente, uma grande quantidade dos genes humanos possuem ilhas de CpGs normalmente desmetiladas em seus promotores, que estão associadas à cromatina pouco compactada. Neste cenário, a transcrição gênica acontece normalmente. Flanqueando estas ilhas ocorrem regiões com menor conteúdo de CGs densamente metiladas e que apresentam a cromatina em conformação compactada, lembrando as regiões de heterocromatina pericentromérica que não são transcritas no genoma (BIRD 2002).

De acordo com o modelo de espalhamento da metilação do DNA proposto por TURKER (2002), a ligação de fatores de transcrição no promotor gênico determina o limite entre as regiões vizinhas densamente metiladas e as ilhas de CpGs desmetiladas e estabelece o equilíbrio entre a atividade transcricional e o avanço da metilação do DNA em direção à região promotora. Este equilíbrio é responsável pelo padrão de metilação normal. Em células tumorais, uma diminuição inicial da

atividade transcricional afeta o equilíbrio entre estas duas forças, permitindo que a metilação se espalhe gradualmente ao longo do promotor gênico, reduzindo as taxas de transcrição paulatinamente. Desse modo, ocorre a formação de alelos com padrão de metilação distintos, ocasionando heterogeneidade entre as subpopulações de um tumor. Uma vez que a atividade transcricional está diminuída, o desencadeamento da metilação na ilha de CpGs atrai outras moléculas envolvidas no processo e promove a alteração da conformação da cromatina, facilitando ainda mais o espalhamento *cis* da metilação. Finalmente, quando uma quantidade suficiente de CGs ou sítios críticos de CGs estão metilados, o silenciamento gênico é estabelecido.



Legenda: Em células normais, as ilhas de CpGs nos promotores estão protegidas do espalhamento da metilação do DNA a partir de regiões periféricas densamente metiladas. Ao redor da região promotora estão dispostas histonas acetiladas e a cromatina está pouco compactada, o que permite que fatores de transcrição se liguem à fita de DNA e ocorra a transcrição gênica. Nas regiões vizinhas densamente metiladas estão presentes histonas deacetiladas e a cromatina está bastante compactada. Neste contexto, complexos com enzimas DNMTs não se aproximam do promotor. Em células tumorais, as DNMTs têm acesso à região promotora, juntamente com MBPs, e a metilação do DNA se espalha a partir das regiões periféricas em direção às ilhas de CpGs. As histonas tornam-se deacetiladas e a cromatina adquire conformação compactada, impedindo a ligação de fatores de transcrição à fita de DNA. Deste modo, é estabelecido o silenciamento gênico. DNMTs, DNA metiltransferases; FT, fator de transcrição; HAT, histona acetil transferase; HDAC, histona deacetilase; HMT, histona metiltransferase; MBPs, proteínas de ligação a CpGs metilados; PCA, proteína co-ativadora.

Fonte: Modificado de JONES e BAYLIN (2002).

Figura 1 – A metilação do DNA em uma ilha de CpG localizada na região promotora de um gene e o silenciamento gênico.

Fundação Antonio Prudente
 Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Coordenadora Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
 PRUDENTE

1.5 A METILAÇÃO DO DNA E O CÂNCER

O papel da metilação do DNA na regulação da expressão gênica é essencial para processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico e a repressão transcricional de seqüências de DNA repetitivo de origem retroviral. Esta função também tem especial importância para a carcinogênese.

A perda da metilação do DNA em dinucleotídeos CGs foi a primeira anormalidade epigenética identificada em células tumorais. FEINBERG e VOGELSTEIN (1983) compararam o padrão de digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação entre células normais e tumorais e descobriram que uma significativa proporção de CpGs metilados em tecidos normais estava desmetilada nas células tumorais. Em seguida, GAMA-SOSA et al. (1983) demonstraram uma redução global de 10 a 20% no conteúdo de citosinas metiladas no genoma de vários tipos de tumores, tanto benignos quanto malignos, quando comparados aos tecidos normais correspondentes. Posteriormente, muitos estudos comprovaram a ocorrência da hipometilação global do genoma de células tumorais provenientes de diferentes neoplasias. Esta modificação do DNA tumoral é observada freqüentemente em diferentes tipos de seqüências repetitivas do genoma, incluindo regiões de heterocromatina do DNA, retrotransposons, retrovírus endógenos e seqüências satélites, bem como em seqüências únicas, incluindo algumas de controle da transcrição. A hipometilação do DNA induz a atividade transcricional dessas seqüências e favorece a instabilidade cromossômica nos tumores. A hipometilação também tem sido associada à expressão diferencial de

oncogenes e antígenos tumorais (EHRlich 2002). A perda de metilação é um evento freqüentemente observado no início do desenvolvimento de tumores, e se correlaciona com a severidade da doença e com o potencial metastático em muitos tipos de tumores (WIDSCHWENDTER et al. 2004; ROBERTSON 2005).

Além da hipometilação global do genoma, as células tumorais também são caracterizadas pela presença de hipermetilação em ilhas de CpGs localizadas nas regiões promotoras de genes relacionados ao câncer. A primeira associação entre hipermetilação e genes supressores de tumor foi feita com o primeiro gene supressor de tumor descoberto, o gene do retinoblastoma (RB) (GREGER et al. 1989). Alguns anos depois, foi descoberto que a inativação dos genes Von Hippel-Lindau, CDKN2A (também conhecido como p16 ou INK4A), E-caderina e do gene de reparo MLH1 também estavam associadas à hipermetilação de suas regiões promotoras (HERMAN et al. 1994; GONZALEZ-ZULUETA et al. 1995; GRAFF et al. 1995; MERLO et al. 1995; KANE et al. 1997). A partir daí, o relato de inativação por hipermetilação de genes envolvidos com diversas funções celulares que estão alteradas nas células tumorais como regulação do ciclo-celular, reparo do DNA, remodelamento da cromatina, sinalização celular, transcrição e apoptose, aumentou progressivamente na literatura.

Alterações no perfil de metilação também estão envolvidas com o surgimento, o desenvolvimento e a progressão de tumores de mama. Na literatura, existem evidências diretas ou indiretas para o silenciamento por metilação de mais de 40 genes relacionados à tumorigênese de mama. Entre eles estão genes envolvidos com a aquisição das seis características essenciais para a sobrevivência das células tumorais, definidas por HANAHAN e WEINBERG (2000): auto-suficiência em

relação a fatores de crescimento (ER, PR, RASSF1A, SOCS1), potencial replicativo ilimitado (p16, p21, ciclina D2, RAR- β), insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento (HIN1, TGF β RII, RFC), evasão da morte celular programada (caspase-8, p53, DAPK, TWIST), angiogênese sustentada (p73, maspina, THBS1), invasão tecidual e metástase (E-caderina, TIMP3, APC, BCSG1, prostatina) (WIDSCHWENDTER e JONES 2002).

1.6 A METILAÇÃO DO DNA COMO MARCADOR MOLECULAR EM CÂNCER DE MAMA

As alterações epigenéticas distinguem-se das modificações genéticas principalmente porque ocorrem com maior frequência, são reversíveis sob tratamento com agentes farmacológicos e ocorrem em regiões definidas de um gene. Além disso, alterações no perfil de metilação são encontradas especificamente em células tumorais, distinguindo-as das células normais. Estas características favorecem a utilização da metilação do DNA nas células tumorais como marcador molecular no diagnóstico precoce de tumores, na avaliação do prognóstico do paciente e da resposta ao tratamento.

A utilização da metilação do DNA como marcador tumoral é vantajosa, já que ao contrário da molécula de RNA e de proteína, o DNA é bastante estável e de fácil manipulação viabilizando a implantação de testes de detecção na rotina clínica. Além disso, devido à alta especificidade e sensibilidade das técnicas utilizadas para avaliar o padrão de metilação (geralmente baseadas em PCR), células tumorais com alterações na metilação podem ser detectadas mesmo em meio a uma grande

quantidade de células normais. Por fim, ao contrário das alterações genéticas, que ocorrem em diferentes regiões do gene e são de tipos diferentes, as alterações no padrão de metilação ocorrem sempre na mesma região, simplificando a metodologia de detecção (VERMA e SRIVASTAVA 2002; ESTELLER 2003; PATEL et al. 2003).

Já foi demonstrado que alterações no perfil de metilação das células tumorais podem ocorrer no início da carcinogênese da mama, podendo ser potencialmente empregadas como indicadores específicos da existência da doença em estádios iniciais (LAIRD 1997; COTTRELL 2004; LAIRD 2005). No entanto, o emprego de marcadores moleculares no diagnóstico precoce do câncer de mama ainda é muito limitado.

A metilação do DNA em genes associados ao câncer de mama também tem sido empregada para avaliar o prognóstico das pacientes (LAIRD 2005; SHINOZAKI et al. 2005). Dentre os genes que vem sendo investigados atualmente está E-caderina (ECAD), que possui papel fundamental na adesão célula-célula em tecidos epiteliais, sendo o principal componente das junções adesivas celulares (TAKEICHI 1991; MAREEL et al. 1995). Em tumores de mama, o silenciamento transcricional do gene E-caderina está relacionado à hipermetilação da ilha de CpG em sua região promotora (GRAFF et al. 1995, 2000). A perda de expressão de E-caderina está associada ao aumento do potencial invasivo e metastático das células tumorais de mama e à diminuição das taxas de sobrevida, conferindo pior prognóstico às pacientes (LIPPONEN et al. 1994; BRACKE et al. 1996; SEMB e CHRISTOFORI 1998). A hipermetilação do promotor do gene E-caderina pode ser detectada em carcinomas ductais *in situ* de mama, mas sua frequência é maior em

carcinomas ductais invasivos e em metástases em sítios secundários do tumor, como linfonodos, demonstrando que a inativação deste gene ocorre no início do desenvolvimento de tumores de mama e aumenta durante sua progressão maligna (GRAFF et al. 2000; NASS et al. 2000).

1.7 A DETECÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA EM FLUIDOS CORPÓREOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER DE MAMA

Muitos trabalhos comprovam que a presença de metilação em genes específicos associados a tumores de mama também pode ser detectada em fluidos corpóreos de pacientes, como plasma ou soro (SILVA et al. 1999, 2002; MÜLLER et al. 2003; HOQUE et al. 2006) e lavado ductal de mama ou fluido aspirado de mamilo (EVRON et al. 2001; KRASSENSTEIN et al. 2004), oferecendo uma forma alternativa de diagnóstico precoce da doença menos invasiva e de alta sensibilidade.

KRASSENSTEIN et al. (2004) avaliaram o perfil de metilação de um painel de 6 genes supressores de tumor (GSTP1, RAR β 2, p16^{INK4a}, p14^{ARF}, RASSF1A e DAPK) em 22 amostras de tumores primários de mama (7 carcinomas ductais *in situ* e 15 carcinomas ductais invasivos) e em amostras pareadas de fluido ductal aspirado de mamilo coletado das mesmas pacientes. A presença de hipermetilação em ao menos um dos genes foi detectada em 100% dos tumores primários de mama e o mesmo gene hipermetilado no tumor foi detectado em 82% (18/22) das amostras pareadas de fluido aspirado de mamilo. Dentre as 18 amostras de fluido aspirado de mamilo em que foi verificada a presença de metilação no DNA, 6 eram provenientes

de pacientes com carcinoma ductal *in situ* e 4 de pacientes com carcinoma ductal invasivo em estadio I. Estes resultados comprovam que a detecção de genes metilados em fluido proveniente da mama pode ser utilizada para o diagnóstico precoce de tumores de mama, incluindo tumores em estadios iniciais.

Os primeiros estudos que evidenciaram que grandes quantidades de DNA poderiam ser detectadas no plasma de pacientes acometidos por diferentes malignidades surgiram na década de 70 (LEON et al. 1977). Contudo, apenas a partir de 1989, pesquisadores demonstraram que o DNA circulante detectado no plasma exibía alterações associadas a diversos tipos de tumores (STROUN et al. 1989; ANKER et al. 1999, 2003; LO 2001).

O DNA neoplásico no soro pode ter origem de células tumorais que invadiram a corrente sanguínea, porém não possuem a capacidade de invadir outros órgãos, ou ainda pode ser originário de células tumorais apoptóticas ou necróticas (VASIOUKHIN et al. 1994; JAHR et al. 2001; SIDRANSKY 2002).

Diversos trabalhos demonstram que a presença de DNA tumoral no plasma ou soro está geralmente associada a um pior prognóstico do paciente em diferentes tipos de tumores, como mama (SILVA et al. 1999), colorretal (LECOMTE et al. 2002), pulmão (GONZALEZ et al. 2000), esôfago (KAWAKAMI et al. 2000), cabeça e pescoço (NAWROZ-DANISH et al. 2004), e próstata (GOESSL et al. 2000), sugerindo seu potencial na detecção de doença metastática. Entretanto, é importante ressaltar que as alterações no DNA características de tumores detectadas em plasma não estão restritas a pacientes que apresentam metástases, e também podem ocorrer em pacientes com tumores em estágios iniciais e não-metastáticos

(HIBI et al. 1998; CHEN et al. 1999; ESTELLER et al. 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; DULAIMI et al. 2004).

HOQUE et al. (2006) avaliaram a presença de células tumorais em plasma de pacientes com tumor de mama através da detecção de metilação em quatro genes (APC, GSTP1, RASSF1A e RAR β 2). Foram incluídos no estudo 93 pacientes com tumor de mama e 76 pacientes-controle. Constatou-se sensibilidade de 62% e especificidade de 87% na metodologia empregada, a qual foi capaz inclusive de detectar 33% dos tumores em estadio inicial incluídos na amostra. Portanto, a detecção de genes metilados no plasma pode ser utilizada como marcador molecular para o diagnóstico precoce de tumores de mama.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a presença de metilação no plasma também pode ser empregada como marcador molecular de prognóstico em pacientes com tumores de mama. Em um destes trabalhos, MÜLLER et al. (2003) avaliaram o valor prognóstico de marcadores moleculares de metilação em soro pré-terapêutico de pacientes com câncer de mama. A partir de uma análise inicial com 39 genes, foram selecionados por *MethyLight* (PCR em tempo real específico para metilação) 5 genes que se incluíam em pelo menos um dos seguintes critérios de seleção: (1) não metilados em plasma de indivíduos saudáveis e metilados em >10% das amostras de plasma de pacientes com tumor primário de mama, ou (2) metilados em $\leq$ 10% das amostras de plasma de indivíduos saudáveis e metilados em >20% das amostras de plasma de pacientes com tumor de mama. Os genes selecionados foram validados em um grupo de 86 pacientes com câncer de mama que não haviam recebido terapia adjuvante, seguindo-se a correlação com a história clínica das pacientes. Os resultados da análise estatística multivariada revelaram que a presença de metilação

nos genes RASSF1A e/ou APC em soro de pacientes com tumor primário de mama estava independentemente associada a um pior prognóstico e aumentava em 5.7 vezes o risco de morte das pacientes, em relação às que não apresentavam metilação nesses genes.

1.8 A DETECÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA EM LINFONODOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Nos últimos anos, muitos marcadores moleculares de metilação que possuem um alto potencial em serem empregados para o diagnóstico precoce do câncer de mama e para a avaliação do prognóstico da doença têm sido investigados em tumores primários e amostras de plasma e lavado ductal de mama, como citado anteriormente. Entretanto, até o momento são encontrados pouquíssimos relatos na literatura sobre a utilização da metilação como marcador molecular para a detecção de metástases em linfonodos. A detecção de células tumorais metastáticas em linfonodos poderia auxiliar a identificação de pacientes portadoras de doenças mais agressivas, com grandes chances de desenvolverem metástases à distância e que necessitariam receber tratamento adjuvante.

GRAFF et al. (2000) e NASS et al. (2000) demonstraram que a presença de hipermetilação no promotor do gene E-caderina pode ser detectada em metástases linfonodais de pacientes com câncer de mama.

CAVALLI et al. (2003) demonstraram que o perfil de metilação das células do tumor primário de mama é muito semelhante ao das células tumorais que migram para o linfonodo sentinela. Neste estudo, o perfil de metilação dos genes TP16,

THBS2, E-caderina, RAR β 2, MINT1, MINT2 e MINT31 foi avaliado em seis amostras pareadas de carcinomas ductais invasivos de mama e linfonodos sentinelas de pacientes cujos linfonodos estavam comprometidos por metástases, segundo a análise histo-patológica. Em 71% dos eventos de metilação, os resultados foram idênticos entre os tumores primários de mama e os linfonodos sentinelas. Dentre os 6 casos avaliados, dois casos não apresentaram nenhuma diferença entre o tumor e o linfonodo sentinela, em uma paciente foram detectados 4 genes hipermetilados no tumor e nenhum deles foi detectado no linfonodo, e nos três casos restantes um dos genes metilados no tumor não estava metilado no linfonodo, e este apresentou metilação em um ou dois genes desmetilados no tumor.

Contudo, nenhum desses trabalhos avaliou a presença de metilação em linfonodos de pacientes com câncer de mama considerados livres de comprometimento pela análise histo-patológica com a finalidade de detectar a presença de células tumorais metastáticas nos linfonodos.

1.9 A FAMÍLIA ADAM

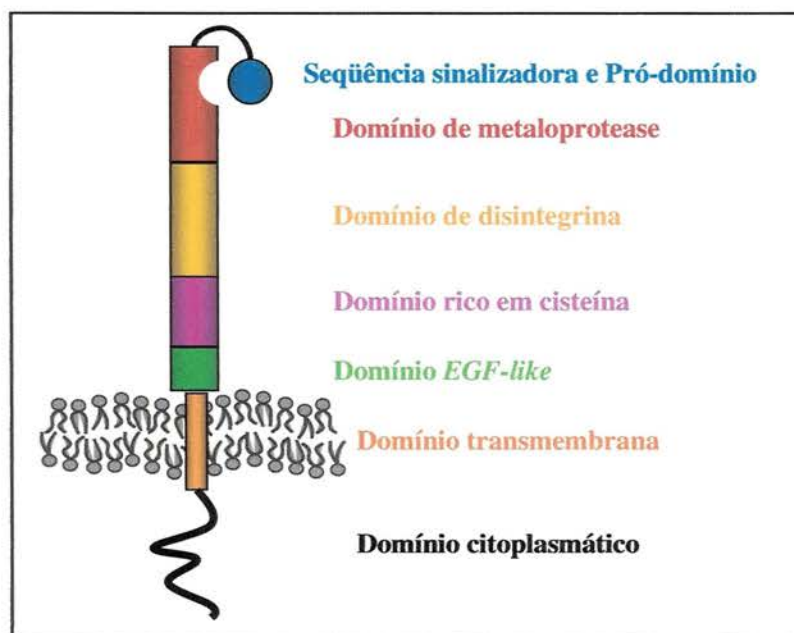
As ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*), também chamadas de MDC (*Metalloprotease-like, Disintegrin-like, Cystein-rich*), são proteínas multifuncionais de superfície celular que possuem atividade proteolítica, modulam interações célula-célula e controlam a adesão à matriz extracelular através de seus múltiplos domínios estruturais (WOLFSBERG et al. 1995a e b; BLACK e WHITE 1998; PRIMAKOFF e MYLES 2000). Até o momento, foram descritos 40 membros

em várias espécies, sendo que destes apenas 21 foram descritos em humanos: ADAM2, 6-12, 15, 17-23, 28-30, 32 e 33 (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

As proteínas ADAMs são caracterizadas pela presença de multidomínios em sua estrutura, muito semelhante a um grupo de proteínas solúveis, as metaloproteases de veneno de cobra (SVMPs) (FOX e BJARNASON 1995). São eles: um pró-domínio e os domínios de metaloprotease, de disintegrina, rico em cisteína, EGF-like, transmembrana e citoplasmático (SCHLÖNDORFF e BLOBEL 1999; PRIMAKOFF e MILES 2000). Dentre eles, destacam-se os domínios de metaloprotease e disintegrina. O primeiro tem como função o processamento de proteínas de membrana (*shedding*), incluindo citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores, e a clivagem e o remodelamento de componentes da matriz extracelular. O segundo é capaz de interagir com integrinas e sindecans, exercendo o papel de adesão celular (PRIMAKOFF e MILES 2000; WHITE 2003).

A atividade do domínio de metaloprotease das ADAMs depende da presença da sequência consenso de aminoácidos HExGHxxGxxHD no sítio catalítico. Em metaloproteases de matriz (MMPs), os três resíduos de histidina (H) deste sítio constituem os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico (E) constitui o sítio ativo (RAWLINGS e BARRETS 1995). Devido à presença destes resíduos conservados, 12 das 21 ADAMs humanas são preditas como cataliticamente ativas, caracterizando esta família como um subgrupo da superfamília de metaloproteases dependentes de zinco. São elas: ADAMs 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 e 33. Os demais membros da família ADAM apresentam este domínio inativo por possuírem um ou mais resíduos de aminoácidos diferentes na região do sítio catalítico (WOLFSBERG et al. 1995a e b; BLACK e WHITE 1998).

Em relação aos outros domínios, sabe-se que o pró-domínio, além de possuir um peptídeo sinal N-terminal que direciona a proteína para a via secretora, é capaz de bloquear a atividade proteolítica, até sua remoção por proteínas tipo furinas ou por atividade autocatalítica, e também de exercer papel de chaperona, auxiliando no correto dobramento das ADAMs, especialmente do domínio metaloprotease. O domínio rico em cisteína tem função na adesão celular auxiliando na interação com integrinas e com outras moléculas da matriz extracelular. O domínio EGF-like tem seu papel pouco caracterizado; o domínio transmembrana é importante para ancorar a proteína à membrana celular e o domínio citoplasmático é capaz de interagir com proteínas da cascata citoplasmática de sinalização intracelular e, possivelmente, com proteínas do citoesqueleto (SEALS e COURTNEIDGE 2003). Na Figura 2 está representada esquematicamente a estrutura de uma proteína da família ADAM.



Fonte: Modificado de SEALS e COURTNEIDGE (2003).

Figura 2 – Representação esquemática de uma proteína da família ADAM e seus domínios característicos.

Em consequência de sua complexidade estrutural, diversos relatos da literatura comprovam o envolvimento de proteínas ADAMs em inúmeros mecanismos celulares, desde processos biológicos fundamentais, como proliferação, adesão e migração celular, até em etapas do desenvolvimento, como fertilização, miogênese, neurogênese e embriogênese. Sendo assim, alterações nas funções dos diferentes membros desta família podem facilitar o estabelecimento de processos patológicos como inflamação e câncer, o que tem sido comprovado por muitos trabalhos (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

1.10 ADAM23

O gene ADAM23 humano foi inicialmente identificado por SAGANE et al. (1998) e, posteriormente, o cDNA de camundongo correspondente à ADAM23 foi clonado pelo mesmo grupo (SAGANE et al. 1999). O gene humano está localizado no cromossomo 2 (2q33) e a proteína ADAM23 apresenta em sua estrutura todos os domínios característicos dos membros da família ADAM. Entretanto, em decorrência da ausência da sequência consenso de aminoácidos no sítio catalítico do domínio metaloprotease, esta proteína não possui atividade proteolítica (RAWLINGS e BARRETS 1995), o que sugere que esteja envolvida preferencialmente com o processo de adesão celular. De fato, já foi demonstrado que a proteína ADAM23 interage com a integrina $\alpha_v\beta_3$ através de seu domínio disintegrina (CAL et al. 2000). GOLDSMITH et al. (2004) demonstraram que ADAM23 é expressa predominantemente como uma proteína de superfície celular ancorada à membrana,

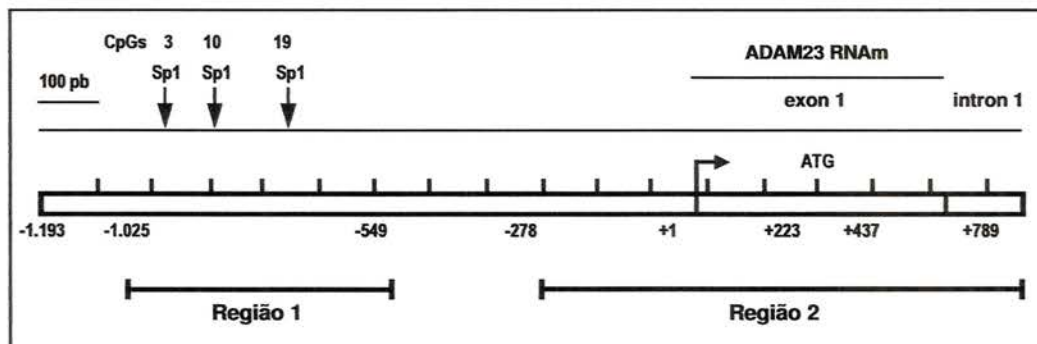
em sítios de contato intercelular, o que corrobora seu papel no processo de adesão celular.

Recentemente, foram descritas duas formas alternativas de splicing do gene ADAM23, denominadas ADAM23 γ e ADAM23 β , que diferem do transcrito previamente descrito por SAGANE et al. (1998) (a partir daqui denominado ADAM23 α), em suas extremidades C-terminais (SUN et al. 2004). A primeira, ADAM23 γ , provavelmente codifica uma forma secretada da proteína ADAM23, devido à ausência de um domínio transmembrana em sua estrutura; já na segunda isoforma, ADAM23 β , o domínio transmembrana está presente, porém é distinto do que ocorre em ADAM23 α .

1.11 ADAM23 E O CÂNCER DE MAMA

A relação entre o gene ADAM23 e o desenvolvimento de tumores de mama foi evidenciada em nosso laboratório. Inicialmente, COSTA et al. (2004) demonstraram que o gene ADAM23 encontra-se freqüentemente silenciado em tumores de mama. Na primeira parte deste trabalho, o nível de expressão do RNA mensageiro foi avaliado em linhagens tumorais de mama. Verificou-se a diminuição ou ausência de expressão do gene ADAM23 em 8 de 12 (66,7%) das linhagens tumorais. A fim de se verificar se a diminuição no nível de expressão do gene ADAM23 estava relacionada a uma possível metilação aberrante da região promotora deste gene, realizou-se uma análise *in silico* e, a partir da sequência genômica humana, obteve-se a região 5' *upstream* do gene ADAM23. Nesta sequência foram identificadas duas prováveis ilhas de CpGs que incluíam uma região

de aproximadamente 1.0 kb *upstream* ao sítio de início de transcrição, juntamente com o primeiro exon e intron (Figura 3). O fato de mais de 100 dinucleotídeos CGs estarem presentes nesta região sugeriu que a metilação realmente poderia influenciar a transcrição do gene ADAM23.



Fonte: Modificado de COSTA et al. (2004).

Legenda: As regiões correspondentes às duas ilhas de CpGs identificadas na região 5' *upstream* do gene ADAM23 estão indicadas na figura como regiões 1 e 2. A posição (+1) pares de bases corresponde ao sítio de início de transcrição. As demais posições foram calculadas a partir dele. A região 1 contém 22 dinucleotídeos CpGs e seu perfil de metilação foi analisado por COSTA et al. (2004).

Figura 3 – Representação esquemática das ilhas CpGs localizadas na região promotora do gene ADAM23.

Na etapa seguinte deste trabalho, o padrão de metilação da região 1 do promotor do gene ADAM23 foi analisado em diferentes linhagens celulares tumorais, bem como em tumores primários de mama. Verificou-se a ocorrência de hipermetilação em 8 de 12 (66,7%) linhagens tumorais de mama e em 9 de 13 (69,2%) tumores primários de mama. Apesar do pequeno número de tumores analisado, uma maior porcentagem de metilação foi verificada em tumores de mama com um estágio mais avançado. Além disso, a presença de metilação na região promotora se mostrou diretamente correlacionada com a diminuição da expressão do

gene ADAM23, sugerindo que este gene provavelmente encontra-se epigeneticamente silenciado durante a progressão dos tumores de mama.

A fim de avaliar a importância da hipermetilação do gene ADAM23 no prognóstico do câncer de mama, Costa et al. (2007 trabalho em desenvolvimento) ampliaram sua análise de metilação para 94 tumores ductais invasivos de mama. A hipermetilação da ilha de CpG localizada na região 1 do gene ADAM23 foi verificada em 31% dos casos através de MSP (do inglês *Methylation Specific PCR*). A presença de metilação nessas regiões foi então associada ao desenvolvimento de metástase à distância e à evolução da doença nas pacientes incluídas no estudo. A análise univariada revelou que pacientes com o gene ADAM23 hipermetilado na região 1 tiveram sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos significativamente menor do que as que não apresentaram ADAM23 hipermetilada (62.1 versus 90.2%, $p < 0.001$, e 78.9% e 93.8%, $p = 0.005$, respectivamente). Em análise multivariada, a hipermetilação deste gene se revelou um fator de prognóstico independente das demais variáveis para a sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos. Estes resultados demonstram que a hipermetilação do gene ADAM23 está fortemente associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama e sugerem que o silenciamento da ADAM23 possa ser utilizado como um marcador molecular de prognóstico em câncer de mama.

Recentemente, TAKADA et al. (2005) verificaram a deleção homozigótica do gene ADAM23 através do *screening* de um painel de 32 linhagens tumorais gástricas, na tentativa de identificar aberrações cromossômicas através da técnica de hibridização genômica comparativa (CGH). Apesar de apenas uma (3.1%) linhagem

tumoral ter apresentado deleção homozigótica do gene ADAM23, a análise de sua expressão revelou que este gene estava silenciado em 13 de 31 (41.9%) linhagens analisadas e que sua expressão estava diminuída em 8/31 (25.8%) linhagens tumorais, quando comparadas ao tecido normal. Em seguida, foi avaliada a atividade promotora das duas ilhas de CpGs do promotor do gene ADAM23 descritas anteriormente por COSTA et al. (2004) (Figura 3). Para isto, quatro fragmentos da região promotora do gene ADAM23, sendo um pertencente à ilha de CpG na região 1 e os outros 3 fragmentos contendo diferentes regiões da ilha de CpG na região 2, foram amplificados e clonados em vetores de clonagem com o gene repórter *Photinus* luciferase, co-transfectados com outro vetor contendo o gene repórter *Renilla* luciferase, utilizado como controle do experimento. Observou-se que um fragmento de 348 pb localizado na ilha de CpG na região 2 possuía maior atividade transcricional. Desta forma, este grupo analisou o padrão de metilação da ilha de CpG na região 2 do promotor do gene ADAM23 e verificou sua hipermetilação em 19/31 (61.3%) linhagens tumorais gástricas e em 7/16 (43.8%) tumores primários gástricos. A presença de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 correlacionou-se inversamente com sua expressão gênica. Finalmente, ensaios de formação de colônias revelaram que a proteína ADAM23 consiste em um fator supressor do crescimento celular. Estes resultados sugerem que o silenciamento epigenético do gene ADAM23 e sua conseqüente perda de função provavelmente têm papel importante durante o desenvolvimento e a progressão de tumores gástricos.

Além de tumores de mama e de estômago, a presença de hipermetilação no gene ADAM23 também foi verificada em outros tipos de tumores. HAGIHARA et

al. (2004) estudaram linhagens tumorais e tumores primários de pâncreas e detectaram ADAM23 hipermetilada em 57% (4/7) das linhagens e 29% (7/24) dos tumores primários de pâncreas, o que estava associado à diminuição da expressão gênica. Recentemente, foi verificada a hipermetilação do gene ADAM23 em tumores de cabeça e pescoço (18/43 amostras, 42%). A análise dos tumores de laringe separadamente revelou a associação entre a presença de ADAM23 hipermetilada e estadios mais avançados do tumor (estadios 3 e 4) ($p=0.005$), sugerindo um papel para ADAM23 na tumorigênese de cabeça e pescoço (CALMON et al. 2007). Diferentemente do que foi observado para os outros tipos de tumores, um estudo realizado com tumores de cérebro revelou que neste tipo de tumor o gene ADAM23 não está hipermetilado, apesar de apresentar uma nítida redução em seu padrão de expressão (COSTA et al. 2005).

OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 como marcador molecular para prever a evolução da doença em pacientes com câncer de mama e para detectar células metastáticas em linfonodos sentinela dessas pacientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil de metilação da Ilha CpG mais próxima ao sítio de início de transcrição no promotor do gene ADAM23 (região 2) em carcinomas ductais invasivos de mama através de MSP e correlacionar os resultados obtidos com os dados clínico-patológicos das pacientes e evolução da doença.
2. Verificar se a ocorrência de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 pode ser detectada em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama e correlacionar a presença de metilação no plasma com dados clínico-patológicos das pacientes e evolução da doença.
3. Verificar se a ocorrência de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 pode ser utilizada como uma ferramenta molecular alternativa e mais sensível para a detecção de células metastáticas em linfonodos sentinela de pacientes com câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Amostras de Tumores Primários

Foram utilizadas 145 amostras de carcinomas ductais invasivos de mama coletadas no Hospital A.C. Camargo e disponíveis no Banco de Tumores deste hospital. O Banco de Tumores foi criado durante a realização do Projeto Genoma Humano do Câncer e a coleta das amostras foi devidamente regularizada e aprovada pelo CONEP (parecer no.728/2000). Todas as amostras armazenadas no Banco de Tumores foram coletadas mediante consentimento informado das pacientes. Dentre as amostras utilizadas, 102 foram coletadas de pacientes operadas entre 1998 e 2001 e possuíam pelo menos 5 anos de seguimento, enquanto as demais (n=43) foram provenientes de pacientes operadas a partir de 2005, durante a realização deste projeto. Todas as amostras de tumores de mama utilizadas neste estudo foram provenientes de indivíduos do sexo feminino.

3.1.2 Amostras de Plasmas

Foram utilizadas 44 amostras de plasma de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, com pelo menos 5 anos de seguimento, coletadas no Hospital A.C. Camargo durante a cirurgia da mama, após o consentimento das pacientes, e disponíveis no Banco de Tumores deste hospital.

Foram avaliadas 37 pacientes cujo tumor primário de mama previamente analisado apresentou hipermetilação no promotor da ADAM23. Como controle da metodologia, foram incluídas na análise amostras de plasma de 7 pacientes em cujo tumor primário de mama previamente analisado não foi detectada a presença da hipermetilação da região promotora da ADAM23.

Também foram utilizadas como controle 28 amostras de plasmas provenientes de mulheres doadoras de sangue no Banco de Sangue do Hospital A.C. Camargo, na faixa etária entre 40 e 75 anos, que não apresentavam nenhuma patologia no momento em que foi realizada a coleta de sangue.

3.1.3 Amostras de Linfonodos Sentinela

Foram utilizadas 97 amostras de linfonodos sentinela removidos de 43 pacientes com tumor de mama. O número de linfonodos extraídos por paciente variou entre 1 e 6 linfonodos, com média de 2.25 linfonodos por paciente. Durante a cirurgia da mama, muitas vezes o linfonodo sentinela é removido juntamente com outros 1-5 linfonodos axilares próximos a ele, e todo o material é enviado para a análise histo-patológica sem discriminação de qual dos linfonodos é o sentinela. Por isso, todos os linfonodos são avaliados pela patologia sem distinção. Uma vez que o material analisado neste trabalho foi proveniente da análise histo-patológica, não foi possível distinguir e analisar apenas o linfonodo sentinela. Sendo assim, apesar de o termo *linfonodo sentinela* significar o primeiro nódulo de uma região linfática que drena um sítio específico de tumor, neste trabalho este termo será empregado para designar não só o primeiro, como também outros linfonodos localizados bem próximos ao sentinela, por uma questão de simplificação.

Durante a ressecção cirúrgica da mama, os linfonodos sentinelas foram identificados utilizando-se os métodos de coloração do sistema linfático com corante azul isossulfano e sua marcação com substância radioativa (tecnécio-99m) paralelamente. Após a remoção do tecido linfonodal, os nódulos foram separados, enviados ao Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo e armazenados em blocos de parafina, seguindo-se a avaliação microscópica para detecção de células tumorais. A presença de macrometástases foi avaliada pelo método de coloração dos cortes com hematoxilina-eosina. Na ausência de macrometástases, a presença de micrometástases foi avaliada através da análise de expressão do antígeno citoceratina AE1/AE3 por imunoistoquímica, empregando-se o método do complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase. Neste trabalho, foram consideradas pacientes com linfonodos comprometidos por metástases todas aquelas em que foi detectada a presença de macro ou micrometástases linfonodais, sem discriminação do tipo de metástase.

Foram avaliados dois grupos distintos:

GRUPO A: 15 indivíduos que apresentaram linfonodos sentinela acometidos por células metastáticas após a análise histo-patológica

GRUPO B: 28 indivíduos que apresentaram linfonodos sentinela livres de células metastáticas após a análise histo-patológica

Paralelamente à análise dos linfonodos sentinela, a presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 também foi avaliada nos tumores primários dessas 43 pacientes.

De acordo com o perfil de metilação do promotor da ADAM23 detectado no tumor primário, as pacientes foram divididas em três grupos.

O primeiro grupo foi formado por 8 pacientes que não apresentaram ADAM23 hipermetilada nos tumores primários de mama, sendo que 5 foram consideradas livres de comprometimento linfonodal, segundo a avaliação histopatológica, e 3 foram consideradas positivas para a presença de células metastáticas. Este grupo foi utilizado para avaliar a especificidade da estratégia proposta, já que não esperávamos detectar ADAM23 metilada em nenhum dos linfonodos das pacientes nele incluídas. Este grupo também nos permitiu verificar se as células metastáticas presentes em linfonodos sentinela possuem o mesmo perfil que as células do tumor primário, no que diz respeito à metilação de ADAM23.

O segundo grupo foi composto por 12 pacientes em cujos tumores de mama detectou-se a presença de hipermetilação no promotor da ADAM23 e que apresentaram linfonodos acometidos por metástase, de acordo com a análise histopatológica. Este grupo foi utilizado como controle da sensibilidade da estratégia proposta para detecção das células tumorais, uma vez que esperávamos detectar ADAM23 metilada em todos os linfonodos das pacientes pertencentes a este grupo.

O terceiro grupo foi formado por 23 pacientes que possuíam tumores de mama em que foi detectada a presença de ADAM23 hipermetilada e que, de acordo com a análise histopatológica, não apresentaram linfonodos comprometidos por metástase. Através desta análise procuramos verificar se a sensibilidade do ensaio de

detecção de metilação é maior do que a da análise histo-patológica, validando a utilização da presença de metilação na região promotora do gene ADAM23 como marcador para a detecção de células metastáticas em linfonodos sentinela.

3.1.4 Amostras de Linfócitos Normais

Foram utilizadas 16 amostras de linfócitos normais provenientes de mulheres que doaram sangue no Hospital A.C. Camargo durante a realização deste projeto e que não apresentavam nenhuma patologia no momento em que foi realizada a coleta de sangue.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

3.2.1 Extração de DNA de Tumores Primários

O DNA de tumores primários de mama foi extraído pelo método convencional de fenol-clorofórmio. Os tumores primários de mama foram incubados a 55°C durante a noite em 4 ml de tampão de extração (10mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 0.5%SDS, pH 8.0), em presença de 100 µg/ml de RNase A e 200 µg/ml de Proteinase K. Após a digestão, adicionou-se 4 ml de fenol equilibrado (pH 8.0) à amostra. Seguiu-se sua agitação por 5 minutos e centrifugação durante 15 minutos a 5.000xg, 4°C. Após a recuperação da fase aquosa, adicionou-se à mesma 4 ml de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguindo-se novamente a agitação da amostra por 5 minutos e sua centrifugação durante 15 minutos a 5.000xg, 4°C. Separou-se novamente a fase aquosa e repetiu-se a extração com clorofórmio-álcool isoamílico. Após esta extração, a fase aquosa foi coletada em tubo corex estéril. A

precipitação de DNA foi realizada adicionando-se 1/10 do volume da amostra de 3M NaAc pH 6.0 e 2.5 vezes do volume final de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 22.000xg, lavadas com etanol 70% e novamente centrifugadas durante 10 minutos a 22.000xg. Após a secagem do DNA à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspendido em 100-500 µl de tampão (10 mM Tris HCl, 1.0 mM EDTA pH 8.0) e armazenado a 4°C. A qualidade dos DNAs extraídos foi avaliada em géis de agarose 0.8% corados com brometo de etídeo e sua concentração foi verificada em espectrofotômetro.

3.2.2 Extração de DNA de Plasma

O plasma foi obtido centrifugando-se cerca de 2 ml de sangue de cada indivíduo durante 5 minutos a 5.000xg. A extração de DNA foi realizada empregando-se o método convencional fenol-clorofórmio, de modo semelhante à extração de DNA de tumores primários, apenas com algumas modificações descritas a seguir. Inicialmente, 1 ml de plasma foi incubado a 55°C durante a noite em 2 ml de tampão de extração contendo 100 µg/ml RNase A e 200 µg/ml Proteinase K. Após a digestão, foram realizadas três extrações, sendo a primeira com 3 ml de fenol equilibrado (pH 8.0), a segunda com solução fenol-clorofórmio (1:1) e a última com solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a coleta do sobrenadante final em tubo corex estéril, adicionou-se 1 µl de glicogênio (20 mg/ml), seguindo-se a precipitação do DNA com 0.3M NaAc pH 6.0 e etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite e, no dia seguinte, após centrifugação e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspendido em 30 µl de tampão e

armazenado a 4°C. A concentração de DNA em cada amostra foi analisada em espectrofotômetro.

3.2.3 Extração de DNA de Linfonodos Sentinela

As amostras de linfonodos sentinela foram coletadas durante a confecção de lâminas destinadas à análise histo-patológica dos linfonodos previamente emblocados em parafina e consistem em restos de tecido produzidos entre um corte e outro do bloco. Previamente à extração do DNA, as amostras foram desparafinizadas. Nesta etapa, uma quantidade de tecido parafinizado suficiente para preencher metade do volume de um tubo de 1.5 ml foi encubada em 1.0 ml de xilol durante 2 horas a 48°C, para remoção da parafina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 16.000xg. Após a remoção da fase aquosa, o tecido foi re-hidratado empregando-se sucessivas lavagens com 100%, 70% e 50% etanol. Após esta etapa, realizou-se a extração do DNA empregando-se um protocolo adaptado ao método convencional fenol-clorofórmio.

Os tecidos desparafinizados foram incubados a 48°C durante 48 horas em 300 µl de tampão de extração (10 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 62.5 mM NaCl, 1% SDS pH 8.8), em presença de 100 µg/ml de RNase A e 1 mg/ml de Proteinase K. Após a digestão, adicionou-se 300 µl de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) às amostras e estas foram transferidas para um tubo *Phase Lock Gel* (Eppendorf), que separa as duas fases da solução, facilitando a remoção da fase aquosa, sem que haja contaminação com a solução de fenol. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 16.000xg, em temperatura ambiente. Após a repetição deste procedimento duas vezes, a fase aquosa foi transferida para um tubo

estéril e adicionou-se 2 µl de glicogênio (20 mg/ml). Seguiu-se a precipitação do DNA com a adição de 1/3 do volume da amostra de 7.5M NH₄OAc e de 2 vezes o volume final da amostra de etanol absoluto gelado. O DNA foi incubado por toda a noite a -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 15.300xg, lavadas com etanol 70% e novamente centrifugadas durante 10 minutos a 15.300xg. Após secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspenso em 50-200 µl de tampão (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) e armazenado a 4°C. A qualidade dos DNAs foi avaliada em géis de agarose 0.8% corados com brometo de etídeo e a concentração de DNA em cada amostra foi analisada em espectrofotômetro.

3.2.4 Extração de DNA de Linfócitos

Para a obtenção dos linfócitos, cerca de 2 ml de sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 5.000xg. Após a centrifugação, observou-se a formação de duas fases: uma fase superior de coloração clara, correspondente ao plasma, e uma fase inferior de coloração vermelho-escura, composta principalmente por hemácias. Entre as duas fases, estava disposto um halo bem fino, de coloração esbranquiçada, correspondente à camada leucocitária. Esta camada foi removida e transferida para um tubo de 1.5 ml.

A extração de DNA dos linfócitos foi realizada empregando-se o método convencional fenol-clorofórmio, de modo semelhante à extração de DNA de tumores primários, exceto pelo volume dos reagentes. Inicialmente, ao volume coletado de cerca de 300 µl de papa linfocitária, adicionou-se 600 µl de tampão de extração contendo 100 µg/ml RNase A e 200 µg/ml Proteinase K. Após a digestão a 55°C durante a noite, foram realizadas três extrações, sendo a primeira com 900 µl de

fenol equilibrado (pH 8.0), e as duas seguintes com solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Durante as extrações, foram utilizados tubos *Phase Lock Gel*, a fim de evitar contaminação entre as fases. Ao final das extrações, seguiu-se a precipitação do DNA com 0.3M NaAc pH 6.0 e etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite e, no dia seguinte, após centrifugação durante 30 minutos a 15.300xg e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspensionado em 100-200 µl de tampão e armazenado a 4°C. A qualidade dos DNAs extraídos foi avaliada em géis de agarose 0.8% corados com brometo de etídeo, e sua concentração foi verificada em espectrofotômetro.

3.3 TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

O DNA extraído a partir dos tumores primários de mama, das amostras de plasma e dos linfonodos sentinelas foi tratado com bissulfito de sódio, que promove a deaminação de citosinas não metiladas em uracilas, as quais são substituídas por timinas durante a síntese de uma nova fita de DNA. As citosinas metiladas (5-metilcitosinas) são mantidas intactas e permanecem como citosinas após a reação de amplificação. O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação do método de JERÓNIMO et al. (2001). Inicialmente, 1 µg de DNA genômico foi misturado a 0.5 µg/µl de DNA de esperma de salmão e a mistura foi desnaturada utilizando 0.3M NaOH. Após incubação a 50°C durante 20 minutos, seguiu-se a modificação do DNA com bissulfito de sódio. Nesta etapa, o DNA foi incubado a 70°C durante 3 horas com 500 µl de uma solução bissulfito de sódio/hidroquinona (2.5 mM NaHSO₃, 350mM NaOH e 125mM C₆H₆O₂), a fim de

promover sua modificação. Em seguida, as amostras foram purificadas utilizando-se uma resina (*Wizard[®] Minipreps DNA purification resin, Promega*) e uma coluna de purificação (*Wizard Minicolumns, Promega*). Seguiu-se uma lavagem com 4 ml de 80% isopropanol, tratamento com 0.3M NaOH para completa deaminação do DNA e sua precipitação com 3M NH₄OAc e 350 µl de etanol absoluto. Na etapa de precipitação do DNA, adicionou-se 1µl glicogênio (20 mg/ml). O DNA modificado foi incubado a -20°C por um período de 16 a 20 horas. No dia seguinte, após centrifugação durante 30 minutos a 15.300xg e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspensionado em 50 µl de tampão (10 mM Tris HCl e 1 mM EDTA pH 8,0).

Para o tratamento com bissulfito de sódio de DNA extraído de linfonodos foram feitas algumas modificações. Na etapa inicial, partiu-se de 2 µg de DNA e durante sua desnaturação com 0.3M de NaOH, o DNA de esperma de salmão foi substituído por glicogênio (1 µg/µl). Esta alteração foi adotada devido à necessidade de quantificação do DNA após seu tratamento com bissulfito de sódio, o que não é possível em DNA tratado pelo método descrito anteriormente, uma vez que a presença de DNA de esperma de salmão interfere na quantificação do DNA da amostra tratada. As demais etapas do método de tratamento descrito anteriormente não foram modificadas, exceto pelo volume final de ressuspensão do DNA, que foi 20 µl.

A eficiência do tratamento do DNA com bissulfito de sódio em amostras de linfonodos sentinela parafinizadas foi avaliada através do tratamento de 1 µg de DNA extraído de linfonodos misturados a 1 µg de DNA plasmidial não metilado contendo um fragmento clonado de aproximadamente 250 pb. Após o tratamento da mistura contendo DNA plasmidial e de linfonodos, o fragmento clonado no

plasmídeo foi amplificado e sequenciado. Como esperado, observamos que todas as citosinas deste fragmento haviam sido convertidas a timinas, demonstrando que o tratamento foi 100% eficiente, sem a interferência de nenhum composto existente nas amostras de linfonodos parafinizadas.

3.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO POR MSP

Neste estudo, o perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 foi analisado por MSP (HERMAN et al. 1996). As amostras de carcinomas ductais invasivos de mama previamente analisadas para a região 1 do promotor do gene ADAM23 pelo Dr. Fabrício Costa foram avaliadas neste projeto quanto ao padrão de metilação da ilha de CpG localizada na região 2. Em relação às amostras de plasma, foi avaliado o perfil de metilação da ilha de CpG 1 da ADAM23. Para as demais amostras de tumores primários de mama e linfonodos sentinela das mesmas pacientes, avaliamos o perfil de metilação das duas ilhas de CpGs localizadas na região promotora do gene ADAM23.

A quantidade de DNA utilizada nas reações de MSP para cada tipo de análise foi variável. Para as reações com DNA extraído de tumores primários de mama, utilizou-se 1 a 2 µl de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. No caso das amostras de plasma, 3 µl do DNA tratado com bissulfito de sódio foi utilizado em reações de amplificação do DNA e, em seguida, 1 a 3 µl do produto destas reações foi utilizado como *template* nas reações de MSP. Já nas reações realizadas com DNA extraído de linfonodos e linfócitos, após o tratamento com bissulfito de sódio, o DNA modificado foi quantificado e 90 ng de DNA foi utilizado em cada reação.

A etapa de desenho dos iniciadores específicos para amplificação do DNA modificado por bissulfito de sódio é extremamente importante. Inicialmente, é preciso considerar que após o tratamento toda a sequência de DNA não-metilada será alterada e, portanto, a sequência dos *primers* também deve ser modificada. Além disso, o DNA resultante do tratamento por bissulfito de sódio é bastante fragmentado, de modo que os fragmentos amplificados por MSP não podem ser muito grandes, com tamanho ideal entre 150 e 200 pb. Sendo assim, o número de dinucleotídeos CGs que podem ser analisados é limitado quando comparado à análise por seqüenciamento direto e, em vista disto, a escolha do local onde são desenhados os *primers* é de fundamental importância. Os *primers* devem englobar dinucleotídeos CGs freqüentemente metilados no tipo de amostra estudada, o que deve ser verificado previamente por seqüenciamento após o tratamento com bissulfito de sódio. Os dinucleotídeos escolhidos também devem estar localizados preferencialmente em elementos reguladores da transcrição gênica (ex. Sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1) e a presença de metilação nesses dinucleotídeos deve estar diretamente relacionada com uma diminuição no nível de transcrição do gene.

A análise da ilha de CpG localizada na região 1 do gene ADAM23 foi realizada empregando-se iniciadores desenhados previamente em nosso laboratório pelo Dr. Fabrício Costa. A escolha de quais dinucleotídeos CGs foram englobados pelos *primers* foi realizada baseando-se na clonagem e seqüenciamento direto da ilha de CpG na região 1 da ADAM23, empregando-se DNA de linhagens tumorais de mama e tumores primários de mama modificados por bissulfito de sódio (COSTA et al. 2004). A posição dos dois pares de iniciadores desenhados pode ser visualizada na

Figura 4. A técnica de MSP foi padronizada anteriormente por nosso grupo para a análise da ilha de CpG localizada na região 1 do promotor do gene ADAM23, utilizando-se como controles DNAs extraídos de duas linhagens celulares (PMC42 e Du4475) e DNA extraído de mama normal com o padrão de metilação já caracterizado (COSTA et al. 2004).

Os iniciadores empregados nas reações de MSP para análise da ilha de CpG 1 foram os seguintes: **ADAM23 U - F:** 5'- ATT GTT TTT **TTG** TTA GAA TGT **TG** - 3' / **ADAM23 U - R:** 5'- TAA AAA AAA CAC AAA AAA **CCA AAC A** - 3' para a situação não-metilada, e **ADAM23 M - F:** 5'- ATT GTT TTT **TCG** TTA GAA TGT **CG** - 3' / **ADAM23 M - R:** 5'- TAA AAA AAA CAC AAA AAA **CCG AAC G** - 3' para a situação metilada. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl por tubo contendo 1X tampão Taq *Platinum* Polimerase (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (*Gibco BRL*), 0,32 µM de cada *primer* e 1U de Taq *Platinum* (Invitrogen). As condições de amplificação foram 10 minutos a 95°C para ativação da enzima, seguido por 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Seguiu-se extensão final de 5 minutos a 72°C. A amplificação por MSP do fragmento localizado na ilha de CpG na região 1 do gene ADAM23 gera um fragmento de 100 pares de bases tanto na reação com iniciadores específicos para a situação metilada, quanto para a situação não-metilada.

A análise da ilha de CpG localizada na região 2 do promotor do gene ADAM23 foi realizada por reações de MSP empregando-se iniciadores específicos descritos por TAKADA et al. (2005). Estes iniciadores foram desenhados nos locais mais freqüentemente metilados da região 2 em linhagens tumorais de estômago em

que o gene ADAM23 estava silenciado (SNU601 e SH101P4), o que foi verificado através do tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguido por sequenciamento.

Os iniciadores empregados nas reações de MSP para análise da ilha de CpG 2 foram os seguintes: **ADAM23-USP-F**: 5'- TTT AGG TTT **GGT GGT** AGT TTT T - 3' / **ADAM23-USP-R**: 5'- AAC CAC TCC **CAA AAC AAA ACA** -3' para a situação não-metilada, e **ADAM23-MSP-F**: 5'- AGG TTC **GGC GGT** AGT TTT C -3' / **ADAM23-MSP-R**: 5'- CCA CTC **CCG AAA CGA AAC G** -3' para a situação metilada. As reações de MSP foram realizadas em condições semelhantes às reações para análise da ilha de CpG na região 1 do promotor da ADAM23 descritas anteriormente, exceto pela ciclagem das reações de amplificação. Adotou-se ciclagem igual àquela empregada por TAKADA et al. (2005), que foi a seguinte: 5 minutos a 94°C, seguido por 31 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 minutos. Seguiu-se extensão final de 7 minutos a 72°C. A amplificação do DNA por MSP na Ilha de CpG localizada na região 2 da ADAM23 gera um fragmento de 137 pares de base para a situação não-metilada, e um fragmento de 132 pares de base para a situação metilada.

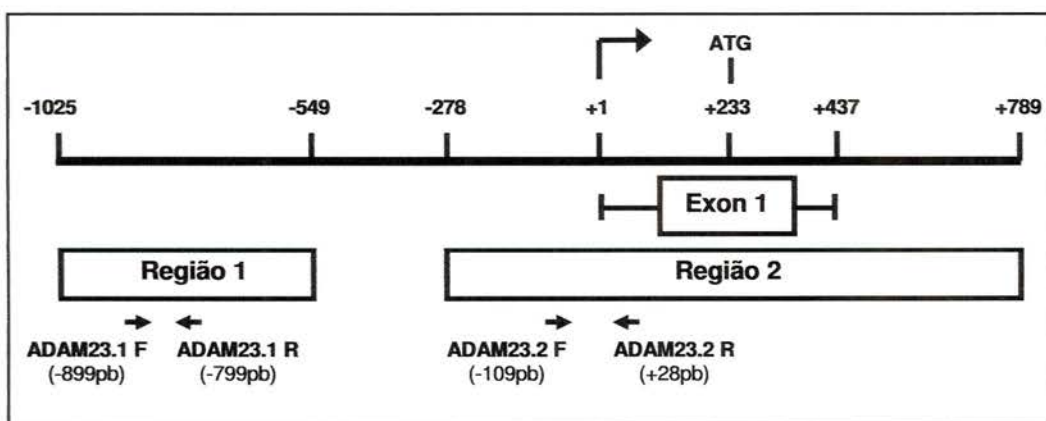
Para as amostras de plasma, foi necessário amplificar o DNA previamente à reação de MSP a fim de aumentar a sensibilidade da reação. Dessa forma, o DNA de plasma foi amplificado com iniciadores desenhados em locais da região 1 do promotor da ADAM23 onde não são encontrados dinucleotídeos CGs, de modo que o perfil de metilação do DNA não interfira em sua amplificação. Esses iniciadores foram desenhados considerando-se a modificação do DNA decorrente de seu tratamento com bissulfito de sódio. Nessas reações, utilizou-se 3 µl de DNA extraído de plasma e tratado com bissulfito de sódio. Foram empregados os seguintes

iniciadores: **ADAMB2 – F:** 5'- GTA TGT AAA TAT AAA GGA TTG TAG -3'/
ADAMB2 – R: 5'- ATA AAA ATA TAT CCT CCT AAA TAT -3'. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl por tubo contendo 1X tampão AmpliTaq Gold Polimerase (*Applied Biosystem*), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (*Gibco BRL*), 1.0 U de AmpliTaq Gold (*Applied Biosystem*), 0,32 µM de cada iniciador. As condições de amplificação da reação foram: desnaturação inicial do DNA por 12 minutos a 94°C, 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento a 45°C por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento a 48°C por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram extendidas por 7 minutos a 72°C. Após as reações de amplificação do DNA de plasma, 1 a 3 µl do produto destas reações foi utilizado como *template* nas reações de MSP.

Nas reações de MSP para a análise da região 2 do gene ADAM23 nas amostras de tumores primários de mama com pelo 5 anos de seguimento, utilizamos como controle para situação não-metilada e metilada DNA extraído das linhagens tumorais de mama PMC-42 e MCF-7, respectivamente. Como controle das reações de MSP com amostras de plasma utilizou-se DNA extraído das linhagens tumorais de mama PMC 42 e SK-BR-3, para a situação não-metilada e metilada, respectivamente. Nas reações de MSP com amostras de tumores primários de mama e linfonodos sentinelas coletados das mesmas pacientes, foram utilizados como controle para a situação não-metilada e metilada DNA extraído de linfócitos de indivíduos normais e DNA de linfócitos normais metilados *in vitro* com a enzima

M.SssI (New England BioLabs), respectivamente. A ausência de metilação nas duas ilhas de CpG do gene ADAM23 em linfócitos de indivíduos normais foi previamente determinada.

Na Figura 4, estão representadas as duas ilhas de CpG no promotor do gene ADAM23. Podemos observar a localização dos iniciadores específicos empregados na amplificação de cada uma das ilhas CpGs, demonstrando os locais analisados por MSP nas duas regiões.



Legenda: As regiões correspondentes às duas ilhas de CpGs identificadas na região 5' *upstream* do gene ADAM23 estão indicadas na figura como regiões 1 e 2. A seta na posição +1 corresponde ao sítio de início de transcrição, utilizado como referência para o cálculo das demais posições, em pares de bases. A posição dos iniciadores específicos empregados nas reações de MSP está demonstrada por setas pequenas. Os números entre parênteses abaixo da denominação de cada iniciador representam a posição exata de sua localização na fita de DNA, em relação ao sítio de início de transcrição.

Figura 4 – Representação esquemática das duas regiões correspondentes às ilhas de CpGs da região promotora do gene ADAM23, demonstrando a localização dos fragmentos de cada região analisados por MSP.

Os produtos das reações de MSP foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, preparados utilizando-se uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, 10% APS como doador de elétrons da reação e TEMED (*Life Technologies*) como catalisador da reação. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram submetidos à coloração com AgNO_3 (SANGUINETTI et al. 1994).

3.5 METILAÇÃO DE DNA DE LINFÓCITOS *IN VITRO*

DNA de linfócitos de indivíduos normais foram metilados *in vitro* utilizando-se a enzima M.Sss I. Inicialmente, 20 µg de DNA foram incubados a 37°C na presença de 1X tampão M.Sss I (*New England BioLabs*), 0.32 mM S-adenosilmetionina e 25 U da enzima metilase M.Sss I, em volume final de 250 µl. Após 4 horas de incubação, acrescentou-se mais 0.64 mM de S-adenosilmetionina e 12.5 U da enzima M.SssI. Seguiu-se mais 4 horas de incubação a 37°C.

Após a modificação do DNA, foi realizada extração com 250 µl de fenol-clorofórmio (1:1). As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 16.000xg, seguindo-se a precipitação do DNA com a adição de 1/3 do volume da amostra de 7.5M NH₄OAc e 2 vezes o volume final da amostra de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite e, no dia seguinte, após centrifugação e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspendido em 100-200 µl de tampão e armazenado a 4°C. A concentração dos DNAs metilados foi verificada em espectrofotômetro.

3.6 CORRELAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE ADAM23 COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

O perfil de metilação do gene ADAM23 detectado nas amostras de tumores primários de mama e de plasma foi correlacionado com os dados clínico-patológicos das pacientes. Esses dados foram levantados a partir dos prontuários das pacientes

arquivados no “Serviço de Arquivo Médico” (SAME) do Hospital A.C. Camargo, sob supervisão de um oncologista e de um patologista. Para cada uma das pacientes foram levantados os seguintes dados clínico-patológicos: data de nascimento, data do diagnóstico da doença, estadio da doença, tamanho do tumor, classificação do grau histológico segundo o sistema SBR (Sistema de Bloom & Richardson), presença e número de linfonodos positivos (0, 1-3, ≥ 4), expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, superexpressão da proteína p53, presença de invasão perineural e linfática, presença de recidivas locais e a distância, realização de quimioterapia, radioterapia e hormônio-terapia (tamoxifeno) adjuvantes, drogas utilizadas na quimioterapia (*CMF* – ciclofosfamida, metotrexate, fluoruracil; *AC* – antraciclina, ciclofosfamida), e status atual do paciente. Neste estudo foram incluídas apenas pacientes sem tratamento neoadjuvante e com pelo menos 5 anos de seguimento.

As reações de imunoistoquímica para receptor de estrógeno (Dako clone 1D5 diluição 1:50), receptor de progesterona (Dako clone 6F11 diluição 1:500) e p53 (Dako clone D07 diluição 1:500) foram realizadas utilizando-se o complexo avidina-biotina. Considerou-se positivos os casos em que ao menos 10% das células tumorais apresentaram marcação nuclear.

As análises estatísticas foram realizadas sob supervisão do Dr. André Carvalho, membro do Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital do A.C. Camargo. A associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A análise de sobrevida livre de metástases em sítios distantes (considerada a partir da data de diagnóstico inicial até a data de diagnóstico de doença metastática em sítio distante ou até o último dia de seguimento) e de sobrevida global específica (considerada a partir da data de

diagnóstico inicial até a data de óbito decorrente de câncer de mama ou até o último dia de seguimento), foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier, e o teste de Log-rank foi aplicado para determinação da diferença estatística entre os grupos e comparação das curvas. A análise multivariada foi realizada pelo método de Regressão de Cox, utilizando todas as variáveis que apresentaram $p < 0.20$ na análise univariada. Para todos os testes foi estabelecido um erro $\alpha = 5\%$, isto é, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Nas análises estatísticas foi utilizado o software SPSS for Windows versão 10.0 (Statistical Package for Social Sciences) (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

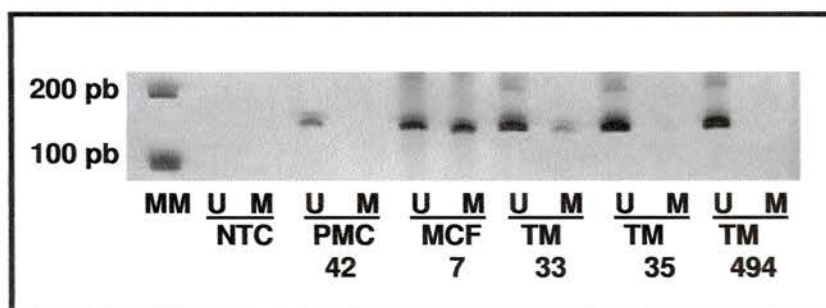
4.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE ADAM23 EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

Como descrito anteriormente, o gene ADAM23 possui duas ilhas de CpGs em sua região promotora, dispostas aproximadamente 1.0 kb *upstream* ao sítio de início de transcrição, juntamente com o primeiro exon e intron. A primeira ilha de CpG (região 1) está localizada mais distante do sítio de início de transcrição (posição -1.025 pb a -549 pb, em relação ao sítio de início de transcrição +1 pb), enquanto a ilha de CpG 2 está disposta ao redor do sítio de início de transcrição (posição -278 pb a +789 pb).

Neste estudo, avaliamos o padrão de metilação da ilha de CpG 2 em 94 amostras de carcinomas ductais invasivos de mama, previamente analisadas quanto ao perfil de metilação da outra ilha de CpG (região 1) pelo Dr. Fabrício Costa em nosso laboratório (Tabela 1). A idade média das pacientes incluídas neste estudo foi 58.9 anos e a mediana, 59.2 anos, sendo a idade mínima igual a 26.2 anos e a idade máxima igual a 92.6 anos. Durante os 5 anos de acompanhamento das pacientes, 20 (21.3%) apresentaram metástases à distância e 15 (16%) morreram em decorrência da doença. A média e a mediana da sobrevida livre de metástases à distância foram de 66.6 e 77.5 meses, respectivamente. Já a média e a mediana da sobrevida global

específica foram 70.5 e 78.2 meses, respectivamente. A probabilidade de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos das 94 pacientes com câncer de mama incluídas neste estudo foi 81.4% e 89.1% respectivamente. Na Tabela 1 estão relacionados os dados clínico-patológicos das pacientes incluídas no estudo.

Para a análise da presença de metilação na região 2 foi utilizada a técnica de MSP, como previamente descrito por HERMAN et al. (1996). A amplificação por MSP do DNA convertido através do tratamento com bissulfito de sódio gera um fragmento de 137 e 132 pares de bases para a situação não-metilada e metilada, respectivamente (Figura 5).



Legenda: Representação da análise do perfil de metilação da região 2 do promotor da ADAM23 em três carcinomas ductais invasivos de mama, TM 33, 35, 494. MM – Marcador de massa molecular 100 pb. NTC – Controle da reação sem DNA. PMC 42 e MCF7 – Linhagens tumorais de mama utilizadas como controle das reações para a situação não-metilada e metilada, respectivamente. U – Não-metilado. M – metilado.

Figura 5 – Avaliação do perfil de metilação da ilha CpG localizada na região 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama.

Fundação Antonio Prudente
 Ana Maria Rodrigues Alves Kuminari
 Coordenadora Pós-Graduação

Tabela 1 - Variáveis clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.

VARIÁVEIS		NÚMERO DE PACIENTES	%
Idade	> 50	65	69.1
	≤ 50	29	30.9
Estádio	I	25	26.6
	II	50	53.2
	III	19	20.2
Tamanho do Tumor	pT1	31	33.0
	pT2	54	57.4
	pT3	9	9.6
SBR*	I	27	29.3
	II	50	54.3
	III	15	16.3
No. de linfonodos positivos	0	49	51.1
	1-3	27	29.8
	≥4	18	19.1
Invasão perineural*	Negativo	58	65.9
	Positivo	30	34.1
Invasão linfática*	Negativo	47	51.1
	Positivo	45	48.9
Receptor de estrógeno	Negativo	36	38.3
	Positivo	58	61.7
Receptor de progesterona	Negativo	63	67.0
	Positivo	31	33.0
Superexpressão de p53*	Negativo	72	78.3
	Positivo	20	21.7
Quimioterapia adjuvante	Ausente	32	34.0
	Sem antracíclicos	39	41.5
	Com antracíclicos	23	24.5
Radioterapia adjuvante	Ausente	17	18.1
	Presente	77	81.9
Tamoxifeno	Ausente	37	39.4
	Presente	57	60.6
ADAM23 – Região 1	Não-metilada	65	69.1
	Metilada	29	30.9
ADAM23 – Região 2	Não-metilada	80	85.1
	Metilada	14	14.9

* Não estão disponíveis as informações de duas pacientes para as variáveis invasão linfática, SBR e p53, e de seis pacientes para a variável invasão perineural.

A presença de hipermetilação na região 2 foi observada em 14.9% (14/94) dos tumores analisados. A comparação entre os resultados obtidos para as regiões 1 e 2 da ADAM23 revelou que 62.8% (59/94) das amostras tumorais não apresentaram

nenhuma das ilhas CpGs metiladas, 8.5% (8/94) dos tumores apresentaram metilação nas duas ilhas CpGs, 22.3% (21/94) das amostras tumorais apresentaram apenas a região 1 hipermetilada e em 6.4% (6/94) dos tumores verificou-se apenas a hipermetilação da região 2. Podemos observar na tabela I que a hipermetilação da ilha CpG localizada na região 1 do promotor da ADAM23 foi verificada com maior frequência do que a hipermetilação na região 2 (30.9% e 14.9%, respectivamente).

Em seguida, investigamos a associação entre a presença de hipermetilação na região 2 do gene ADAM23 e as variáveis clínico-patológicas das pacientes utilizadas na rotina clínica. A fim de permitir a comparação entre os resultados de hipermetilação da região 2 e os resultados obtidos previamente para a região 1, as análises estatísticas estão apresentadas em conjunto na Tabela 2.

Tabela 2 – Associação entre a presença de hipermetilação nas ilhas de CpGs 1 e 2 da região promotora do gene ADAM23 e as variáveis clínico-patológicas das pacientes.

VARIÁVEIS	REGIÃO 1		p	REGIÃO 2		p
	NÃO-MET. (%)	MET. (%)		NÃO-MET. (%)	MET. (%)	
Idade						
> 50	44 (67.7)	21 (32.3)	0.647	56 (86.2)	9 (13.8)	0.756
≤ 50	21 (72.4)	8 (27.6)		24 (82.8)	5 (17.2)	
Estadio						
I	20 (80.0)	5 (20.0)	0.281	24 (96.0)	1 (4.0)	0.184
II	34 (68.0)	16 (32.0)		40 (80.0)	10 (20.0)	
III	11 (57.9)	8 (42.1)		16 (84.2)	3 (15.8)	
Tamanho do tumor						
pT1	24 (77.4)	7 (22.6)	0.381	28 (90.3)	3 (9.7)	0.030
pT2	36 (66.7)	18 (33.3)		47 (87.0)	7 (13.0)	
pT3	5 (55.6)	4 (44.4)		5 (55.6)	4 (44.4)	
SBR*						
I	21 (77.8)	6 (22.2)	0.255	23 (85.2)	4 (14.8)	0.991
II	35 (70.0)	15 (30.0)		43 (86.0)	7 (14.0)	
III	8 (53.3)	7 (46.7)		13 (86.7)	2 (13.3)	
No. linfonodos pos.						
0	36 (73.5)	13 (26.5)	0.147	46 (93.9)	3 (6.1)	0.039
1-3	20 (74.1)	7 (25.9)		21 (77.8)	6 (22.2)	
≥4	9 (50.0)	9 (50.0)		13 (72.2)	5 (27.8)	
Invasão perineural*						
Negativo	41 (70.7)	17 (29.3)	0.698	50 (86.2)	8 (13.8)	0.542
Positivo	20 (66.7)	10 (33.3)		24 (80.0)	6 (20.0)	
Invasão linfática*						
Negativo	35 (74.5)	12 (25.5)	0.206	43 (91.5)	4 (8.5)	0.067
Positivo	28 (62.2)	17 (37.8)		35 (77.8)	10 (22.2)	
Receptor de estrogênio						
Negativo	25 (69.4)	11 (30.6)	0.961	32 (88.9)	4 (11.1)	0.417
Positivo	40 (69.0)	18 (31.0)		48 (82.8)	10 (17.2)	
Receptor progesterona						
Negativo	40 (63.5)	23 (36.5)	0.090	55 (87.3)	8 (12.7)	0.539
Positivo	25 (80.6)	6 (19.4)		25 (80.6)	6 (19.4)	
Superexpressão p53*						
Negativo	51 (70.8)	21 (29.2)	0.356	65 (90.3)	7 (9.7)	0.011
Positivo	12 (60.0)	8 (40.0)		13 (65.0)	7 (35.0)	
Quimioterapia adj.						
Ausente	21 (65.6)	11 (34.4)	0.806	30 (93.8)	2 (6.3)	0.124
Sem antracíclicos	27 (69.2)	12 (30.8)		33 (84.6)	6 (15.4)	
Com antracíclicos	17 (73.9)	6 (26.1)		17 (73.9)	6 (26.1)	
Radioterapia adj.						
Ausente	14 (82.4)	3 (17.6)	0.193	15 (88.2)	2 (11.8)	1.0
Presente	51 (66.2)	26 (33.8)		65 (84.4)	12 (15.6)	
Tamoxifeno						
Ausente	22 (59.5)	15 (40.5)	0.101	32 (86.5)	5 (13.5)	0.762
Presente	43 (75.4)	14 (24.6)		48 (84.2)	9 (15.8)	

* Não estão disponíveis as informações de duas pacientes para as variáveis invasão linfática, SBR e p53, e de seis pacientes para a variável invasão perineural.

As associações estatisticamente significativas ($p < 0.05$) estão destacadas em vermelho.

Não havia sido constatada associação estatisticamente significativa entre a presença de hipermetilação na região 1 do gene ADAM23 e nenhuma das variáveis clínico-patológicas das pacientes analisadas. Entretanto, a presença de hipermetilação na ilha de CpG 2 do promotor do gene ADAM23 foi associada a tamanho do tumor ($p=0.03$), número de linfonodos comprometidos por metástases ($p=0.039$) e superexpressão da proteína p53 ($p=0.011$).

A fim de avaliar a relação entre a presença de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 e a sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos, realizamos uma análise de sobrevida pelo método Kaplan-Meier. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise univariada de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica.

VARIÁVEIS		SOBREVIDA LIVRE DE METÁSTASE À DISTÂNCIA		SOBREVIDA GLOBAL ESPECÍFICA	
		PROBABILIDADE (%)	P	PROBABILIDADE (%)	P
Idade	> 50	83.8	0.335	92.1	0.144
	≤ 50	75.9		82.8	
Estadio	I	96.0	0.004	96.0	0.208
	II	79.3		85.6	
	III	65.5		88.9	
Tamanho do tumor	pT1	96.8	0.026	100.0	0.075
	pT2	74.6		82.8	
	pT3	66.7		88.9	
SBR	I	96.2	0.021	100.0	0.006
	II	81.6		87.7	
	III	57.4		72.7	
Número de linfonodos positivos	0	98.0	<0.001	98.0	<0.001
	1-3	72.9		85.0	
	≥4	45.9		70.6	
Invasão perineural	Ausente	86.1	0.101	91.2	0.156
	Presente	67.4		82.8	
Invasão linfática	Negativo	91.5	0.027	95.7	0.047
	Positivo	69.6		81.8	
Receptor de estrogênio	Negativo	71.2	0.066	79.6	0.028
	Positivo	87.5		94.8	
Receptor de progesterona	Negativo	78.6	0.463	86.8	0.585
	Positivo	86.8		93.6	
Superexpressão de p53	Negativo	85.5	0.068	94.3	0.007
	Positivo	65.0		70.0	
Quimioterapia adjuvante	Ausente	86.9	0.123	100	0.035
	Sem antracíclicos	86.9		87.2	
	Com antracíclicos	64.7		77.8	
Radioterapia adjuvante	Ausente	81.5	0.789	94.1	0.990
	Presente	81.3		88.1	
Tamoxifeno	Ausente	68.7	0.003	74.8	<0.001
	Presente	89.1		98.2	
ADAM23 Região 1	Não-metilada	90.2	<0.001	93.8	0.005
	Metilada	62.1		78.9	
ADAM23 Região 2	Não-metilada	85.7	<0.018	92.3	0.037
	Metilada	57.1		71.4	
ADAM23 Regiões 1 e 2	Não-metilada	91.0	<0.001	93.1	<0.001
	Uma região met.	74.1		92.4	
	2 regiões met.	37.5		50.0	

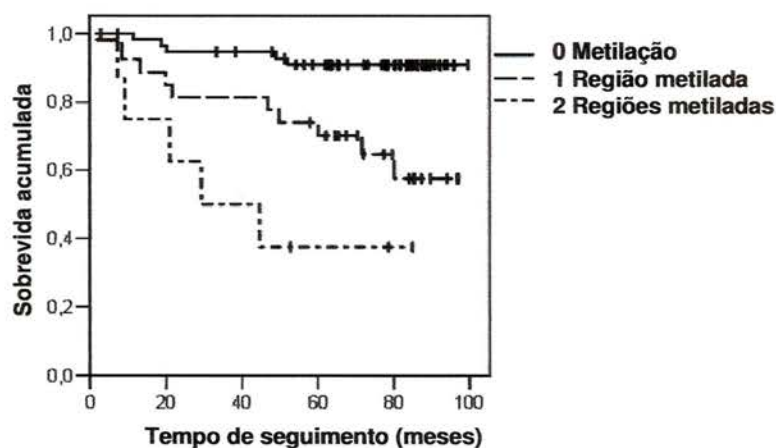
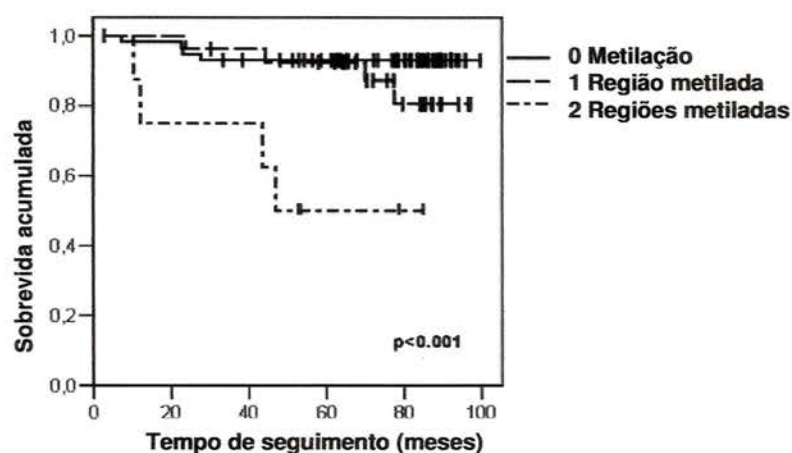
Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) estão destacados em vermelho.

A presença de hipermetilação em qualquer uma das ilhas de CpGs localizadas na região promotora do gene ADAM23 está fortemente associada a um pior prognóstico. As pacientes que apresentaram metilação na região 1 da ADAM23 tiveram sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica inferiores às que não apresentaram ADAM23 metilada (62.1 vs. 90.2 $p<0.001$ e 78.9 vs. 93.8 $p=0.005$, respectivamente). Em relação à hipermetilação da região 2 da ADAM23, as pacientes nas quais foi constatada metilação nesta região também tiveram menor sobrevida livre de metástases à distância e menor sobrevida global específica do que as que não apresentaram metilação (57.1 vs. 85.7 $p<0.018$ e 71.4 vs. 92.3 $p=0.037$, respectivamente).

A fim de avaliar se a presença de hipermetilação nas duas ilhas de CpGs poderia estar associada a um prognóstico ainda pior para as pacientes com câncer de mama, realizamos uma análise estatística combinada de hipermetilação nas duas regiões do promotor da ADAM23. Observamos que a probabilidade de sobrevida livre de metástases à distância foi de 91% para as pacientes que não apresentaram nenhuma das regiões da ADAM23 metilada, 74.1% para as que apresentaram apenas uma região metilada e 37.5% para as que apresentaram as duas regiões metiladas ($p<0.001$). Em relação à sobrevida global específica em 5 anos, pacientes que não apresentaram ADAM23 metilada tiveram probabilidade de sobrevida igual a 93.1%, as que apresentaram apenas uma das regiões metilada tiveram probabilidade igual a 92.4% e nas que apresentaram as duas regiões do promotor da ADAM23 metiladas, a probabilidade de sobrevida global específica em 5 anos diminuiu para 50.0% ($p<0.001$). Na Figura 6 estão representadas as curvas de sobrevida das pacientes com

câncer de mama, de acordo com o perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23.

Como pode ser verificado na Tabela 3, outros fatores analisados influenciaram as taxas de sobrevida livre de metástases à distância e de sobrevida global específica em 5 anos, como grau histológico, número de linfonodos comprometidos por metástases, invasão linfática e uso de tamoxifeno. As variáveis estadio e tamanho do tumor tiveram influência significativa apenas sobre sobrevida livre de metástases à distância, enquanto receptor de estrógeno, superexpressão da proteína p53 e quimioterapia adjuvante foram significativos exclusivamente para sobrevida global específica em 5 anos.

A**B**

Legenda: A – Sobrevida livre de metástases à distância. B – Sobrevida global específica. 0 Metilação – ausência de ADAM23 metilada. 1 Região metilada e 2 Regiões metiladas – ADAM23 metilada em uma ou duas regiões analisadas, respectivamente.

Figura 6 - Curvas de sobrevida em 5 anos das pacientes com câncer de mama, em relação ao perfil de metilação das duas regiões no promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama.

Com o objetivo de avaliar se a presença de hipermetilação no gene ADAM23 é um fator de prognóstico independente para pacientes com câncer de mama, realizamos uma análise estatística multivariada (Regressão de Cox) para os fatores associados ao risco de desenvolvimento de metástases à distância e ao risco de óbito em decorrência de tumor de mama. Foram incluídas nesta análise as variáveis clínico-patológicas que apresentaram $p < 0.20$ na análise univariada, incluindo o uso de quimioterapia adjuvante e terapia hormonal com tamoxifeno. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise multivariada para risco de desenvolvimento de metástases à distância e risco de óbito decorrente de câncer de mama em 5 anos.

VARIÁVEIS	SOBREVIDA LIVRE DE METÁSTASE À DISTÂNCIA			SOBREVIDA GLOBAL ESPECÍFICA		
	HR	IC (95%)	p	HR	IC (95%)	p
No. de linfonodos positivos						
0	1.0	ref.		1.0	ref.	
1-3	12.65	2.84 - 56.28	0.001	26.66	2.80 - 254.08	0.004
≥4	14.37	3.75 - 55.08	<0.001	16.56	1.91 - 143.74	0.011
Tamoxifeno						
Ausente	1.0	ref.		1.0	ref.	
Presente	0.14	0.05 - 0.39	<0.001	0.05	0.01 - 0.28	0.001
ADAM23						
Não-metilada	1.0	ref.		1.0	ref.	
Metilada em uma região	6.53	2.07 - 20.57	0.001	2.30	0.52 - 10.07	0.270
Metilada em duas regiões	8.84	2.31 - 33.76	0.001	9.97	1.96 - 50.61	0.006

HR = Hazard ration e IC = intervalo de confiança (95%)

As variáveis clínico-patológicas número de linfonodos comprometidos por metástases, uso de tamoxifeno e presença de hipermetilação em uma ou duas regiões do gene ADAM23 revelaram-se fatores independentes para sobrevida livre de

metástases à distância e sobrevida global específica por câncer em 5 anos. Como podemos observar na Tabela IV, a presença de hipermetilação em uma ilha de CpG ou nas duas ilhas de CpGs do gene ADAM23 confere 6.53 e 8.84 maior risco de desenvolver metástases à distância às pacientes com câncer de mama, respectivamente, em relação às que não apresentaram metilação em nenhuma das regiões (referência) ($p=0.001$). De modo semelhante, as pacientes que apresentaram as duas ilhas CpGs metiladas tiveram maior chance de óbito em decorrência da doença ($HR=9.97$, $p=0.006$) do que as que tiveram apenas uma região metilada ($HR=2.30$, $p=0.27$) ou não apresentaram metilação em nenhuma das regiões (referência). Em conjunto, os resultados da análise de sobrevida demonstram que a presença de hipermetilação nas duas ilhas de CpGs do promotor do gene ADAM23 possui um valor prognóstico superior à presença de metilação em apenas uma delas.

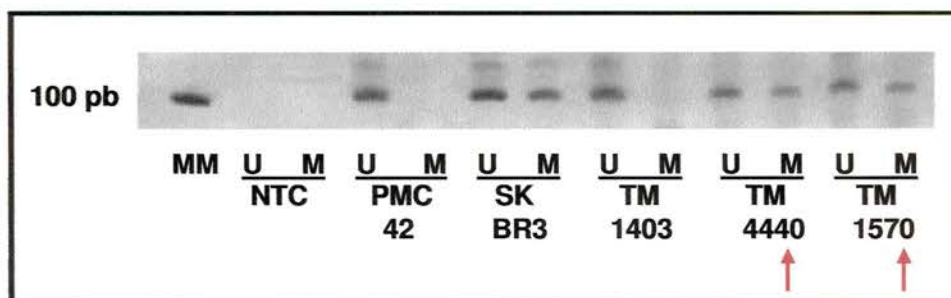
4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE ADAM23 EM PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Demonstramos anteriormente que a presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 em tumores primários de mama está associada a um pior prognóstico das pacientes e a uma diminuição das taxas de sobrevida livre de metástase à distância e sobrevida global específica em 5 anos. Considerando estas informações, avaliamos se a presença de ADAM23 hipermetilada em amostras de plasma de pacientes com tumor de mama poderia conferir-lhes um prognóstico ainda pior e influenciar suas taxas de sobrevida.

Dessa forma, analisamos a presença de hipermetilação na região 1 em 37 amostras de plasma de pacientes cujos tumores primários de mama apresentaram ADAM23 metilada nesta região. A presença de metilação na região 2 não foi realizada nas amostras de plasma devido à quantidade limitada de DNA recuperado a partir de amostras de plasma e à maior frequência de hipermetilação observada na região 1, em relação à região 2, nos tumores primários de mama.

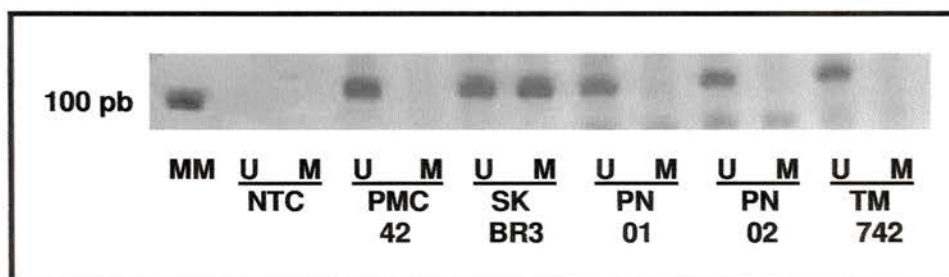
A idade média das pacientes incluídas no estudo foi 62.5 anos e a mediana, 61.0 anos. Durante os 5 anos de seguimento das pacientes, 10 (27.0%) apresentaram metástases à distância e 6 (16.2%) morreram em decorrência da doença. Na Tabela 5 estão relacionadas as variáveis clínico-patológicas das 37 pacientes. Dentre as 37 amostras, 29 haviam sido incluídas na análise de metilação em tumores primários descrita no item anterior.

A hipermetilação do promotor do gene ADAM23 foi detectada em 19 das 37 (51.4%) amostras de plasma (Figura 7). A presença de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 também foi analisada em amostras de plasma de 7 pacientes com câncer de mama cujo tumor primário não apresentou ADAM23 metilada e em 28 amostras de plasma de mulheres saudáveis, com idade entre 40 e 75 anos. Estes dois grupos representaram controles da especificidade da nossa metodologia e, como era esperado, não foi detectada presença de hipermetilação no gene ADAM23 em nenhuma destas amostras (Figura 8).



Legenda: Representação da análise do perfil de metilação da região 1 do promotor do gene ADAM23 em três amostras de plasma, *TM 1403*, *4440* e *1570*. *MM* – Marcador de massa molecular 100 pb. *NTC* – Controle da reação sem DNA. *PMC 42* e *SKBR3* – Linhagens tumorais de mama utilizadas como controle das reações para a situação não-metilada e metilada, respectivamente. *U* – Não-metilado. *M* – metilado. O tamanho do fragmento amplificado na situação não-metilada e metilada é 100 pb. As setas destacam duas amostras de plasma em que foi observado produto amplificado metilado, além do não-metilado.

Figura 7 – Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama.



Legenda: Representação da análise do perfil de metilação da região 1 do promotor do gene ADAM23 em duas amostras de plasma de mulheres saudáveis, *PN 01* e *PN 02*, e uma amostra de plasma de paciente com tumor de mama que não apresentou ADAM23 hipermetilada no tumor primário, *TM 742*. *MM* – Marcador de massa molecular 100 pb. *NTC* – Controle da reação sem DNA. *PMC 42* e *SKBR3* – Linhagens tumorais de mama utilizadas como controle das reações para a situação não-metilada e metilada, respectivamente. *U* – Não-metilado. *M* – metilado. O tamanho do fragmento amplificado na situação não-metilada e metilada é 100 pb.

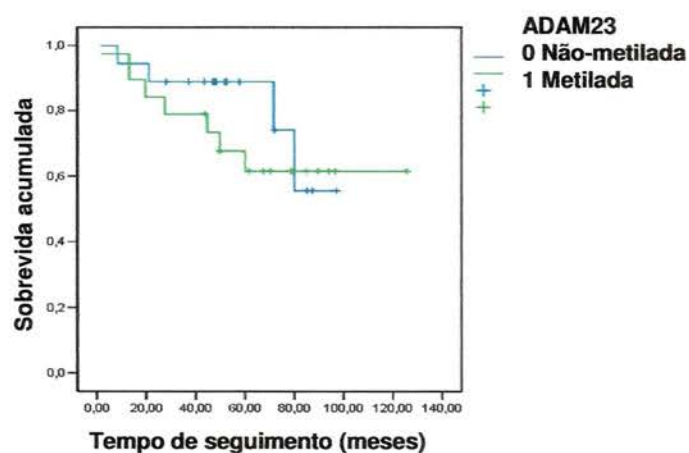
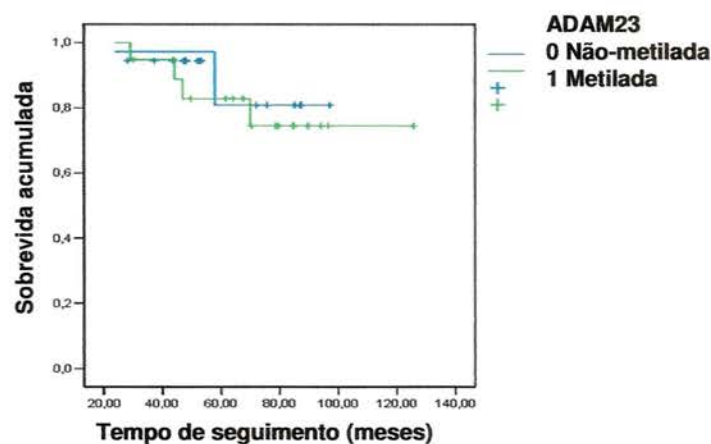
Figura 8 – Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 em amostras de plasma de mulheres saudáveis e de pacientes com câncer de mama sem ADAM23 metilada no tumor primário.

Tabela 5 – Variáveis clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.

VARIÁVEIS		NÚMERO DE PACIENTES	%
Idade	> 50	27	73.0
	≤ 50	10	27.0
Estadio	I	7	18.9
	II	22	59.5
	III	8	21.6
Tamanho do Tumor	pT1	8	21.6
	pT2	22	59.5
	pT3	7	18.9
SBR*	I	7	19.5
	II	17	47.2
	III	12	33.3
No. de linfonodos positivos	0	20	54.1
	1-3	9	24.3
	≥4	8	21.6
Invasão perineural*	Negativo	26	74.3
	Positivo	9	25.7
Invasão linfática*	Negativo	18	58.0
	Positivo	13	42.0
Receptor de estrógeno	Negativo	15	40.5
	Positivo	22	59.5
Receptor de progesterona	Negativo	25	67.5
	Positivo	12	32.5
Superexpressão de p53*	Negativo	24	64.8
	Positivo	13	35.2
Quimioterapia adjuvante	Ausente	11	30.5
	Sem antracíclicos	16	44.5
	Com antracíclicos	9	25
Radioterapia adjuvante	Ausente	4	11.1
	Presente	32	88.9
Tamoxifeno	Ausente	18	48.6
	Presente	19	51.4
ADAM23 – Região 1	Não-metilada	19	51.4
	Metilada	18	48.6

* Não estão disponíveis as informações de uma paciente para as variáveis SBR, quimioterapia adjuvante e radioterapia adjuvante, de duas pacientes para a variável invasão perineural e de seis pacientes para a variável invasão linfática.

A fim de verificar se a presença de hipermetilação no gene ADAM23 em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama poderia conferir-lhes pior prognóstico e influenciar as taxas de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos, realizamos uma análise de sobrevida (Figura 9).

A**B**

Legenda: A – Sobrevida livre de metástases à distância. B – Sobrevida global específica. 0 – ADAM23 não-metilada. 1 – ADAM23 metilada.

Figura 9 – Curvas de sobrevida em 5 anos, em relação ao perfil de metilação da ADAM23 em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama.

Podemos observar na Figura 9 que a taxa de sobrevida livre de metástases à distância em 5 anos é menor nas pacientes que apresentaram metilação do gene ADAM23 no plasma em relação as que não apresentaram (67.7% versus 88.9%,

$p=0.490$), no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa. Da mesma forma, a taxa de sobrevida global específica em 5 anos é menor nas pacientes que apresentaram metilação do gene ADAM23 no plasma em relação as que não apresentaram (80.9% versus 82.9%, $p=0.609$), no entanto esta diferença também não é estatisticamente significativa.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE ADAM23 EM LINFONODOS SENTINELAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

O último objetivo deste estudo foi avaliar se a presença de metilação na região promotora do gene ADAM23 poderia ser utilizada como uma ferramenta molecular para a detecção indireta de células tumorais em linfonodos de pacientes com câncer de mama e se esta metodologia apresentaria maior sensibilidade de detecção quando comparada à análise histo-patológica convencional.

Foram incluídas no estudo 43 pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, sendo que 15 foram consideradas portadoras de linfonodos comprometidos por metástases pela análise histo-patológica (N1) e 28 foram consideradas livres de comprometimento linfonodal (N0).

Inicialmente, o perfil de metilação da ADAM23 para as regiões 1 e 2 foi avaliado nos tumores primários de mama das 43 pacientes e, em seguida, foi realizada a avaliação de seus respectivos linfonodos sentinelas. Foram avaliados 97 linfonodos, sendo 37 pertencentes a 15 pacientes N1 e 60 pertencentes a 28 pacientes N0. Em alguns casos, mais de um linfonodo localizados próximos ao sentinela foram

removidos durante a cirurgia. Como todos os linfonodos removidos são enviados à patologia sem discriminação específica de qual deles é o sentinela, todos os linfonodos removidos foram incluídos em nossas análises e neste trabalho foram denominados de linfonodos sentinelas, por uma questão de simplificação.

A presença de hipermetilação em ao menos uma das ilhas de CpGs no promotor do gene ADAM23 foi verificada em 80% (12/15) dos tumores primários de mama de pacientes que possuíam linfonodos acometidos por metástases (N1) e em 82.14% (23/28) dos tumores primários de mama de pacientes sem comprometimento linfonodal (N0). De modo semelhante ao que foi observado para o primeiro grupo composto por 94 pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, a presença de hipermetilação na região 1 do promotor do gene ADAM23 foi observada com maior frequência do que na região 2. Entre as 12 pacientes N1 com ADAM23 metilada no tumor primário, foi detectada hipermetilação na região 1 em 12 pacientes (80% do total de pacientes N1) e na região 2 em apenas uma paciente (6.67% do total de pacientes N1) (Tabela 8). Em relação às pacientes N0, 23 (82.14% do total de pacientes N0) apresentaram ADAM23 hipermetilada na região 1 e, entre elas, 8 (28.6% do total de pacientes N0) também apresentaram hipermetilação na região 2 (Tabela 9).

Inicialmente, avaliamos a especificidade de nossa metodologia e também se o perfil de metilação da região promotora do gene ADAM23 verificado nas células do tumor primário é semelhante ao das células metastáticas nos linfonodos. Para isto, analisamos o perfil de metilação do promotor da ADAM23 em linfonodos de 8 pacientes cujos tumores primários de mama não apresentaram ADAM23 hipermetilada, sendo 5 pacientes N0 e 3 pacientes N1. Esperávamos não observar

metilação no promotor da ADAM23 em nenhuma destas amostras. Entretanto, em uma das pacientes N0, verificamos a presença de ADAM23 hipermetilada na região 1 em 2 de 3 linfonodos da paciente (Tabela 6). Resultado semelhante foi observado para uma das pacientes N1 (Tabela 7). Estes resultados foram confirmados por dois experimentos independentes, sugerindo que as células metastáticas nem sempre possuem o mesmo perfil que as células do tumor primário, em relação ao padrão de metilação da ADAM23. No entanto, não podemos descartar também a possibilidade de ocorrer troca das amostras durante a extração de DNA e tratamento com bissulfito de sódio.

Tabela 6 – Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N0.

PACIENTE	A23.R1 TUMOR	A23.R2 TUMOR	A23.R1 LINFONODOS	A23.R2 LINFONODOS	Nº DE LINFONDOS ANALISADOS
0.1	0	0	0	0	2
0.2	0	0	0	0	1
0.3	0	0	1 (2)	0	3
0.4	0	0	0	0	2
0.5	0	0	0	0	1

Legenda: A23.R1 = ilha de CpG na região 1 do promotor do gene ADAM23 e A23.R2 = ilha de CpG na região 2 do promotor do gene ADAM23. 0 = ausência de metilação e 1 = presença de metilação. O número entre parênteses demonstra em quantos linfonodos analisados foi detectada a presença de metilação.

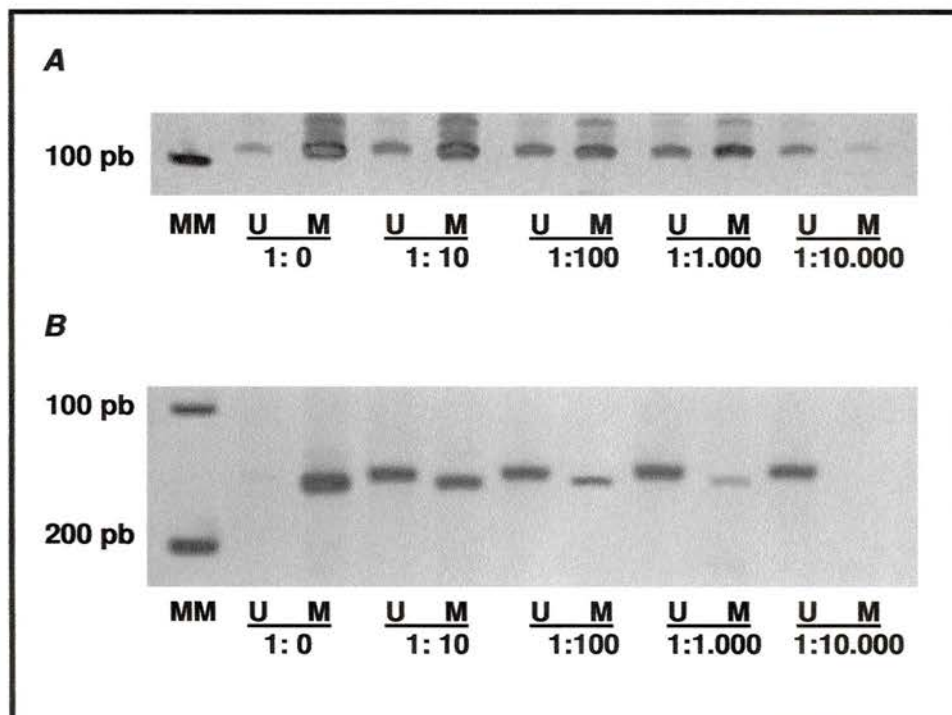
Tabela 7 – Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N1.

PACIENTE	A23.R1 TUMOR	A23.R2 TUMOR	A23.R1 LINFONODOS	A23.R2 LINFONODOS	Nº DE LINFONODOS ANALISADOS
1.1	0	0	0	0	1
1.2	0	0	0	0	1
1.3	0	0	1 (2)	0	3

Legenda: A23.R1 = ilha de CpG na região 1 do promotor do gene ADAM23 e A23.R2 = ilha de CpG na região 2 do promotor do gene ADAM23. 0 = ausência de metilação e 1 = presença de metilação. O número entre parênteses demonstra em quantos linfonodos analisados foi detectada a presença de metilação.

HERMAN et al. (1996), ao descreverem a técnica de MSP, relataram uma sensibilidade de 0.1%, ou seja, seu método foi capaz de detectar até 1 alelo metilado em meio a 1.000 alelos não-metilados. Para verificar se a mesma sensibilidade estava sendo atingida em nossos experimentos com os iniciadores específicos para amplificar as ilhas de CpGs 1 e 2 do promotor do gene ADAM23, realizamos reações de MSP utilizando diferentes proporções de DNA de linfócitos normais metilados *in vitro* em meio a DNA de linfócitos normais não-metilados. Utilizamos as seguintes proporções: 1:0 (100% de alelos metilados), 1:10 (1 alelo metilado em meio a 10 alelos não-metilados), 1:100 (1 alelo metilado em meio a 100 alelos não-metilados), 1:1.000 (1 alelo metilado em meio a 1.000 alelos não-metilados) e 1:10.000 (1 alelo metilado em meio a 10.000 alelos não-metilados). Nas reações de MSP com os iniciadores específicos para amplificar a região 2 do promotor da ADAM23, atingimos a mesma sensibilidade detectada por HERMAN et al. (1996) (Figura 10B). Entretanto, as reações feitas com iniciadores específicos para amplificar a ilha de CpG 1 na região promotora do gene ADAM23 tiveram sensibilidade 10 vezes maior

do que o que havia sido verificado anteriormente, pois foi possível identificar um alelo metilado em meio a 10.000 alelos não-metilados (Figura 10A).



Legenda: As reações de MSP foram realizadas utilizando as seguintes proporções de DNA de linfócitos normais metilados em meio a DNA de linfócitos normais não-metilados: 1:0, 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. *MM* – Marcador de massa molecular 100 pb. *U* – Não-metilado. *M* – metilado. **A** – **Região 1.** O tamanho do fragmento amplificado na reação para a ilha de CpG 1 do gene ADAM23 é 100 pb tanto para a situação não-metilada, quanto para a metilada. **B** – **Região 2.** A reação para a ilha de CpG 2 do gene ADAM23 amplifica fragmentos de 137 pb e 132 pb para a situação não-metilada e metilada, respectivamente.

Figura 10 – Teste da sensibilidade do MSP para as regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23.

Em seguida, avaliamos a sensibilidade de nossa metodologia em amostras de linfonodos sentinelas. Para isto, analisamos os linfonodos de pacientes N1 cujo tumor primário de mama apresentou hipermetilação em pelo menos uma das duas regiões do gene ADAM23 analisadas. Como era esperado, 100% (12/12) dessas

pacientes apresentaram hipermetilação do gene ADAM23 nos linfonodos, confirmando a sensibilidade do método. Observamos uma total correlação entre o perfil de metilação do tumor primário e o perfil encontrado nos linfonodos. Nas pacientes em que a região 1 do promotor da ADAM23 estava metilada no tumor, o mesmo foi verificado nos linfonodos. De modo semelhante, para a única paciente que apresentou ADAM23 hipermetilada na região 2, isto também foi observado no tecido linfonodal (Tabela 8, Figura 11).

Tabela 8 - Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N1.

PACIENTE	A23.R1 TUMOR	A23.R2 TUMOR	A23.R1 LINFONODOS	A23.R2 LINFONODOS	Nº DE LINFONODOS ANALISADOS
1.4	1	0	1 (1)	0	1
1.5	1	0	1 (1)	0	1
1.6	1	0	1 (1)	0	3
1.7	1	0	1 (2)	0	4
1.8	1	0	1 (3)	0	3
1.9	1	1	1 (5)	1 (1)	6
1.10	1	0	1 (2)	0	4
1.11	1	0	1 (1)	0	2
1.12	1	0	1 (1)	0	1
1.13	1	0	1 (2)	0	2
1.14	1	0	1 (1)	0	2
1.15	1	0	1 (2)	0	3

Legenda: A23.R1 = ilha de CpG na região 1 do promotor do gene ADAM23 e A23.R2 = ilha de CpG na região 2 do promotor do gene ADAM23. 0 = ausência de metilação e 1 = presença de metilação. O número entre parênteses demonstra em quantos linfonodos analisados foi detectada a presença de metilação.

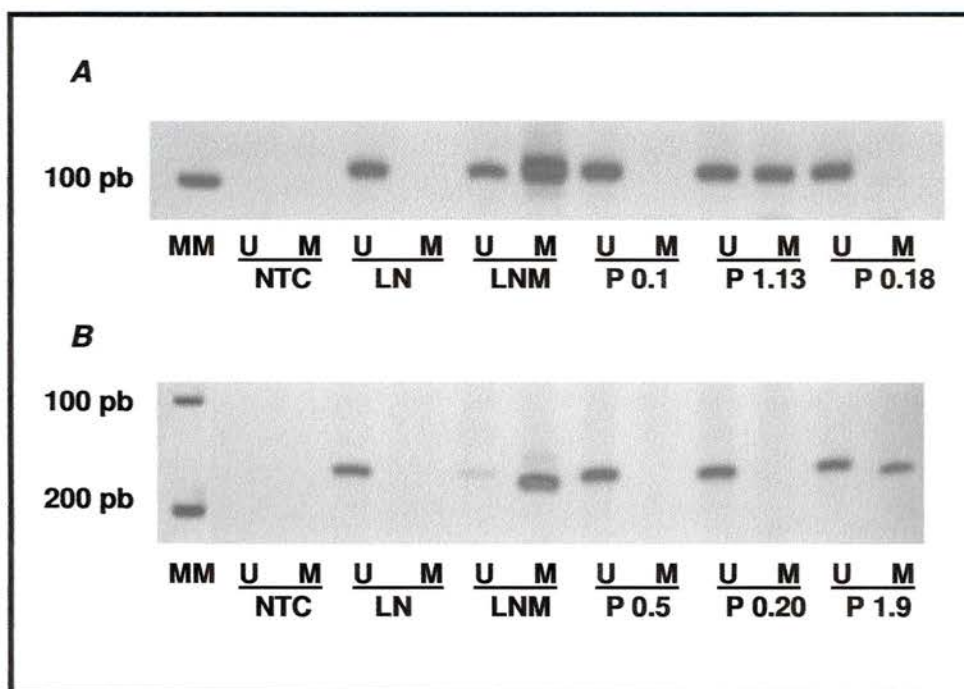
Finalmente, o perfil de metilação do promotor do gene ADAM23 também foi avaliado em um grupo composto por 23 pacientes N0 e em cujo tumor primário de mama detectou-se a presença de ADAM23 hipermetilada. Verificamos a presença de hipermetilação na região 1 da ADAM23 nos linfonodos de 86.9% (20/23) das pacientes. Entretanto, apesar de em 8 pacientes também ter sido detectada a presença de ADAM23 hipermetilada na região 2 nos tumores primários de mama, em nenhuma delas isto foi observado em seus linfonodos (Tabela 9, Figura 11).

Tabela 9 – Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em tumores primários de mama e nos linfonodos de pacientes N0.

PACIENTE	A23.R1 TUMOR	A23.R2 TUMOR	A23.R1 LINFONODOS	A23.R2 LINFONODOS	Nº DE LINFONODOS ANALISADOS
0.6	1	1	1 (4)	0	4
0.7	1	0	1 (1)	0	3
0.8	1	0	1 (2)	0	5
0.9	1	0	1 (1)	0	1
0.10	1	1	1 (1)	0	1
0.11	1	0	0	0	2
0.12	1	1	1 (4)	0	4
0.13	1	1	1 (2)	0	3
0.14	1	0	1 (1)	0	1
0.15	1	0	1 (2)	0	2
0.16	1	1	1 (1)	0	1
0.17	1	0	1 (1)	0	1
0.18	1	1	0	0	1
0.19	1	0	1 (3)	0	4
0.20	1	0	1 (1)	0	2
0.21	1	0	1 (2)	0	2
0.22	1	0	1 (3)	0	3
0.23	1	0	1 (1)	0	3
0.24	1	0	1 (1)	0	1
0.25	1	1	1 (1)	0	2
0.26	1	0	0	0	1
0.27	1	1	1 (2)	0	2
0.28	1	0	1 (2)	0	2

Legenda: A23.R1 = ilha de CpG na região 1 do promotor do gene ADAM23 e A23.R2 = ilha de CpG na região 2 do promotor do gene ADAM23. 0 = ausência de metilação e 1 = presença de metilação. O número entre parênteses demonstra em quantos linfonodos analisados foi detectada a presença de metilação.

Fundação Antonio Prudente
Marina Botte
 Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Coordenadora Pós-Graduação



Legenda: Representação da análise do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor da ADAM23 em amostras de linfonodos sentinelas de pacientes N0 (*P* 0.1, 0.5, 0.18 e 0.20) e de pacientes N1 (*P* 1.13 e 1.9). *MM* – Marcador de massa molecular 100 pb. *NTC* – Controle da reação sem DNA. *LN* – Linfócito normal, utilizado como controle para a situação não-metilada. *LNM* – Linfócito normal metilado, utilizado como controle para a situação metilada. *U* – Não-metilado. *M* – metilado. **A – Região 1.** O tamanho do fragmento amplificado na reação para a ilha de CpG 1 do gene ADAM23 é 100 pb tanto para a situação não-metilada, quanto para a metilada. **B – Região 2.** A reação para a ilha de CpG 2 do gene ADAM23 amplifica fragmentos de 137 pb e 132 pb para a situação não-metilada e metilada, respectivamente.

Figura 11 – Avaliação do perfil de metilação das regiões 1 e 2 do promotor do gene ADAM23 em amostras de linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença ocasionada pelo acúmulo de alterações genéticas que ocorrem principalmente em três tipos de genes: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de estabilidade (*"caretakers"*). Além de alterações genéticas, modificações epigenéticas também estão diretamente envolvidas com a tumorigênese como, por exemplo, o silenciamento por metilação do DNA de genes supressores de tumor e de estabilidade, e a ativação de oncogenes e de genes que sofrem *imprinting* por hipometilação de suas sequências regulatórias (ESTELLER e HERMAN 2002; JONES e BAYLIN 2002).

As alterações epigenéticas, destacando-se a hipermetilação das regiões promotoras de genes supressores de tumor associada ao silenciamento gênico, afetam todas as etapas da progressão tumoral e são encontradas em todos os tipos de neoplasias humanas (JONES e LAIRD 1999; BAYLIN e HERMAN 2000). Nos tumores de mama, são encontradas na literatura evidências diretas ou indiretas para o silenciamento por metilação de mais de 40 genes envolvidos nas etapas de formação, desenvolvimento e progressão do câncer de mama (WIDSCHWENDTER e JONES 2002).

Muitos trabalhos comprovam que a metilação do DNA em células tumorais pode ser utilizada como marcador molecular extremamente sensível e específico para o diagnóstico precoce de tumores, a avaliação do prognóstico das pacientes e da resposta ao tratamento (LAIRD 1997; JONES e BAYLIN 2002; COTTRELL 2004; LAIRD 2005). Além de tumores primários de mama, a presença de alterações no

perfil de metilação tem sido detectada com sucesso em plasma e lavado ductal de mama ou fluido aspirado do mamilo de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, oferecendo um método menos invasivo de diagnóstico do tumor (SILVA et al. 1999, 2002; EVRON et al. 2001; MÜLLER et al. 2003; KRASSENSTEIN et al. 2004; HOQUE et al. 2006). A detecção de genes hipermetilados em plasma também está associada a um pior prognóstico das pacientes, podendo ser utilizada na avaliação da evolução da doença (MÜLLER et al. 2003).

Neste trabalho, o perfil de metilação do gene ADAM23, um potencial candidato a gene supressor de metástase, foi avaliado em amostras de carcinomas ductais invasivos de mama, plasma e linfonodos de pacientes diagnosticadas com câncer de mama.

Inicialmente, foi avaliado o padrão de metilação da ilha de CpG localizada próximo ao sítio de início da transcrição (região 2) em 94 amostras de carcinomas ductais invasivos previamente analisadas para a outra ilha de CpG (região 1) pelo Dr. Fabrício Costa. A hipermetilação das ilhas de CpGs nas regiões 1 e 2 do promotor da ADAM23 foi observada em 31% (29/94) e 14.9% (14/94) dos casos, respectivamente, demonstrando que em tumores de mama a ilha de CpG 1 está mais freqüentemente metilada. Não foi encontrada associação significativa entre a presença de hipermetilação na região 1 e nenhuma das variáveis clínico-patológicas incluídas no estudo. Entretanto, a ocorrência de hipermetilação na ilha de CpG 2 do promotor da ADAM23 foi associada a tamanho do tumor, número de linfonodos comprometidos por metástases e superexpressão da proteína p53. A presença de hipermetilação na ilha de CpG 1 ou 2 do gene ADAM23 influenciou significativamente a sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global

específica em 5 anos, conferindo pior prognóstico às pacientes. Quando avaliadas em conjunto, a hipermetilação nas duas ilhas de CpGs se mostrou mais fortemente associada a um pior prognóstico, reduzindo ainda mais as taxas de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos do que a metilação em apenas uma das ilhas. Por fim, a presença de hipermetilação em uma ou duas ilhas de CpGs da região promotora do gene ADAM23 revelou-se um fator de prognóstico independente para a sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos. As pacientes que apresentaram metilação nas duas ilhas de CpGs da ADAM23 tiveram maior risco de desenvolver metástases e maior risco de óbito do que as pacientes que apresentaram apenas uma região metilada ou não apresentaram metilação em nenhuma das ilhas.

De acordo com o modelo de espalhamento da metilação de DNA proposto por TURKER (2002), o equilíbrio entre a atividade transcricional e o avanço da metilação do DNA em direção à região promotora é responsável pelo padrão de metilação em células normais. Em células tumorais, uma diminuição inicial da atividade transcricional afetaria o equilíbrio entre estas duas forças, permitindo que a metilação se espalhe gradualmente a partir de regiões vizinhas densamente metiladas em direção ao promotor gênico, de modo que quando uma quantidade suficiente de CGs ou sítios críticos de CGs estão metilados, o gene é silenciado.

Baseado no modelo de Turker, podemos sugerir que no gene ADAM23 a metilação tem início na ilha de CpG 1, localizada mais distante do sítio de início de transcrição e, portanto, mais próxima às regiões vizinhas densamente metiladas. Durante o desenvolvimento tumoral, a metilação se espalharia ao longo do promotor até atingir a ilha de CpG 2, disposta nas redondezas do sítio de início de transcrição.

O resultado da hipermetilação das duas regiões é o completo silenciamento do gene ADAM23. Desse modo, a ausência de expressão do gene ADAM23 em pacientes com câncer de mama que apresentaram as duas ilhas de CpGs hipermetiladas confere-lhes pior prognóstico.

O gene ADAM23 pertence a uma família de proteínas de superfície celular caracterizadas pela presença de multidomínios em sua estrutura, destacando-se o domínio de metaloprotease e o de disintegrina. Os membros desta família são capazes de exercer atividade proteolítica, modular interações célula-célula e controlar a adesão à matriz extracelular (WOLFSBERG et al. 1995a e b; BLACK e WHITE 1998; PRIMAKOFF e MYLES 2000). Entretanto, a proteína ADAM23 não possui atividade proteolítica, devido à ausência da sequência consenso de aminoácidos no sítio catalítico de seu domínio metaloprotease (RAWLINGS e BARRETS 1995), e parece estar envolvida preferencialmente com o processo de adesão celular. Já foi demonstrado que a proteína ADAM23 é capaz de interagir com a integrina $\alpha_v\beta_3$ através de seu domínio disintegrina (CAL et al. 2000). Esta interação, além de ser fundamental em processos celulares normais, também parece estar relacionada com a tumorigênese de mama. Em câncer de mama, $\alpha_v\beta_3$ está expressa de forma aberrante em tumores invasivos e metástases distantes, o que caracteriza seu envolvimento com a progressão tumoral (LIAPIS et al. 1996). A ativação de $\alpha_v\beta_3$ também está associada com o aumento da atividade da metaloprotease de matriz tipo 9 (MMP-9), favorecendo a migração celular e promovendo ativamente a formação de metástases em tumores de mama (FELDING-HABERMANN et al. 2001; ROLLI et al. 2003).

Neste trabalho, verificamos que a hipermetilação da região promotora do gene ADAM23 é um evento freqüente em tumores de mama e está associada a um maior risco de desenvolvimento de metástases à distância e maior chance de óbito em pacientes com câncer de mama que apresentaram as duas ilhas de CpGs hipermetiladas. Sendo assim, sugerimos que, quando silenciado, a ausência de expressão do gene ADAM23 contribui para a progressão de tumores de mama provavelmente por diminuir a adesão entre as células tumorais e deixar livre a integrina $\alpha_v\beta_3$, favorecendo sua ativação, que está relacionada à aquisição do potencial invasivo e metastático em células tumorais de mama. Desse modo, as células tumorais se tornam capazes de se desprender do tumor primário e migrar pela matriz extracelular, etapas iniciais e fundamentais para a formação de metástases.

Neste estudo, a presença de metilação no gene ADAM23 (ilha de CpG 1) também foi avaliada em plasma de pacientes diagnosticadas com câncer de mama e em cujo tumor primário foi detectada a presença de ADAM23 hipermetilada. Através desta análise, pretendíamos avaliar se a presença de hipermetilação no gene ADAM23 em plasma poderia conferir um pior prognóstico e influenciar as taxas de sobrevida das pacientes com câncer de mama. A presença de ADAM23 hipermetilada foi verificada em 51.4% (19/37) das amostras de plasma. A análise de sobrevida revelou que não houve diferença significativa entre as taxas de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos das pacientes que apresentaram ADAM23 hipermetilada no plasma e as pacientes que não apresentaram. Estes resultados demonstram que a presença de hipermetilação no gene ADAM23 no plasma não é capaz de prever a evolução da doença em pacientes que apresentam ADAM23 hipermetilada no tumor primário, ou seja, não

interfere no risco de desenvolvimento de metástases e de morte em decorrência da doença, uma vez que a presença de hipermetilação no tumor primário já corresponde a um fator de pior prognóstico extremamente significativo. Entretanto, a presença de metilação no gene ADAM23 no plasma poderia ser utilizada para o acompanhamento das pacientes com tumor de mama que apresentam ADAM23 hipermetilada no tumor primário, uma vez que sua detecção no plasma das pacientes indica a presença de células tumorais, sinalizando um possível ressurgimento do tumor.

O último objetivo deste estudo foi avaliar se a presença de metilação na região promotora do gene ADAM23 poderia ser utilizada como uma ferramenta alternativa indireta bastante sensível e específica de detecção de células tumorais metastáticas em linfonodos. A metodologia utilizada apresentou 100% de sensibilidade, pois detectamos a presença de ADAM23 hipermetilada nos linfonodos de todas as pacientes que possuíam comprometimento linfonodal, de acordo com a análise histo-patológica, e que apresentaram hipermetilação no promotor da ADAM23 nos tumores primários. Além disso, observamos uma total correlação entre o perfil de metilação do tumor primário e o perfil encontrado nos linfonodos, no que diz respeito às regiões hipermetiladas no gene ADAM23 nos dois tecidos analisados.

Entretanto, em duas pacientes que não apresentaram a região promotora do gene ADAM23 hipermetilada no tumor primário de mama, sendo que uma das pacientes possuía linfonodos comprometidos por metástases e a outra não, segundo a análise histo-patológica, detectamos metilação no linfonodo, sugerindo que o método não é específico. No entanto, é possível que este resultado esteja refletindo a heterogeneidade do tumor. Sabemos que os tumores são formados por subpopulações de células que sofrem alterações genéticas e epigenéticas distintas. A proliferação de

cada célula tumoral individualmente, processo denominado expansão clonal, origina subpopulações com características e potencialidades diferentes. No caso destas pacientes, é possível que em uma pequena subpopulação ou em células isoladas do tumor primário o gene ADAM23 tenha sido silenciado por metilação, conferindo vantagens a estas poucas células tumorais, que adquiriram um maior potencial invasivo e migratório e foram capazes de migrar e se estabelecer no linfonodo. Entretanto, nas outras subpopulações do tumor, o gene ADAM23 não sofreu alterações, permanecendo desmetilado.

Nossos resultados demonstram que, em alguns tumores, as células metastáticas não possuem o mesmo perfil que as células do tumor primário de mama, em relação ao padrão de metilação da ADAM23. Um outro estudo (CAVALLI et al. 2003) avaliou o perfil de metilação de sete genes (TP16, THBS2, E-caderina, RAR β 2, MINT1, MINT2 e MINT31) em seis amostras pareadas de carcinomas ductais invasivos de mama e linfonodos sentinelas de pacientes cujos linfonodos estavam comprometidos por metástases, segundo a análise histo-patológica. Foi observado que o perfil de metilação das células do tumor primário de mama é muito semelhante ao das células tumorais que migram para o linfonodo sentinela. Entretanto, em três casos, um dos genes metilados no tumor não estava metilado no linfonodo, que apresentou metilação em um ou dois genes desmetilados no tumor, comprovando que, em alguns casos, as células metastáticas apresentam padrão de metilação distinto das células do tumor primário.

Por fim, avaliamos a presença de metilação no promotor do gene ADAM23 em linfonodos de 23 pacientes sem comprometimento linfonodal, de acordo com a análise histo-patológica, em cujo tumor primário de mama foi detectada ADAM23

hipermetilada. Verificamos a presença de hipermetilação na região 1 da ADAM23 nos linfonodos de 86.9% (20/23) das pacientes, sugerindo a presença de células tumorais metastáticas.

Outros trabalhos que utilizaram técnicas moleculares, como RT-PCR e RT-PCR em tempo real, a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de micrometástases em linfonodos, em relação aos métodos histo-patológicos convencionais de coloração com hematoxilina-eosina (H&E) e imunoistoquímica para citoceratinas, relatam um aumento na detecção de células metastáticas em cerca de 10 a 30% dos linfonodos considerados livres de comprometimento (OOKA et al. 2000; OUELLETTE et al. 2004; WEIGELT et al. 2004; NISSAN et al. 2006).

NISSAN et al. (2006), por exemplo, empregaram um painel com três marcadores moleculares, sendo um marcador de células epiteliais não-específico, citoceratina 19 (CK-19), e dois marcadores específicos de células tumorais de mama, mamaglobina B (MGB-2) e NY-BR-1, para avaliar a presença de micrometástases em 30 linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama e compararam seus resultados com os da análise histo-patológica convencional de avaliação do status linfonodal. Eles verificaram que a utilização de RT-PCR aumentou a sensibilidade de detecção de micrometástases em linfonodos em 23.3%, em relação a H&E e imunoistoquímica, e em 30%, em comparação a H&E. WEIGELT et al. (2004) empregaram um painel com quatro genes, citoceratina 19 (CK19), fator trefoil-3 (p1B), glicoproteína epitelial-2 (EGP2) e mucina epitelial pequena de mama (SBEM), e avaliaram a presença de células tumorais em 70 linfonodos sentinelas não comprometidos por metástases, segundo a análise histo-patológica convencional.

Neste estudo, a técnica de RT-PCR em tempo real revelou-se mais sensível do que a análise histo-patológica convencional em 10% das amostras.

Provavelmente, estas técnicas moleculares permitem a identificação de cerca de 30% das pacientes com câncer de mama sem comprometimento linfonodal ao diagnóstico que sofrem recidivas e morrem em decorrência da doença (FISHER e GEBHARDT 1978). Os estudos demonstram que o emprego de um painel de marcadores moleculares possui maior sensibilidade para detecção de micrometástases do que apenas um gene, uma vez que os tumores de mama apresentam alta heterogeneidade biológica e marcadores tumorais expressos em um tumor muitas vezes não são expressos em outros. Sendo assim, é necessária a identificação de novos marcadores moleculares específicos e sensíveis capazes de detectar a presença de células metastáticas em linfonodos de pacientes com câncer de mama. Dentre os marcadores moleculares que vêm sendo investigados, as citoceratinas, marcadores de células epiteliais, possuem especificidade limitada para detecção de células tumorais de mama, enquanto outros marcadores como mamaglobina (MGB1), mamaglobina 2 (MGB2), NY-BR1 e antígeno carcinoembriogênico (CEA) têm se revelado mais específicos, porém são capazes de identificar apenas uma parcela dos tumores (OOKA et al. 2000; WEIGELT et al. 2004; NISSAN et al. 2006; GIMBERGUES et al. 2007). Neste sentido, a utilização da metilação do DNA possui um alto potencial para detecção de células metastáticas em linfonodos, uma vez que é uma alteração específica de células tumorais e que as técnicas empregadas para avaliar a presença de metilação são extremamente sensíveis. Entretanto, até o momento não são encontrados relatos na literatura que avaliaram a utilização da metilação para detectar indiretamente a presença de células

tumorais metastáticas em linfonodos. Este é o primeiro trabalho que avaliou esta estratégia.

Em nosso estudo, a presença de hipermetilação no gene ADAM23 foi detectada em 86,9% das pacientes com câncer de mama que não possuíam linfonodos comprometidos por metástases, segundo a análise histo-patológica, sugerindo que os linfonodos destas pacientes estão comprometidos por células metastáticas. Este número é bastante superior ao que tem sido observado em outros trabalhos, provavelmente em decorrência da alta sensibilidade da técnica de MSP, capaz de detectar um alelo metilado em meio a 10.000 alelos não-metilados. É possível que o MSP seja mais sensível que as demais técnicas moleculares já empregadas para verificar o status linfonodal e que esteja, inclusive, detectando células isoladas de tumor nos linfonodos. A relevância clínica de micrometástases e células isoladas de tumor detectadas em linfonodos sentinelas ainda não está definida e os relatos na literatura são controversos. Alguns estudos sugerem que a presença de micrometástases linfonodais está associada a pior prognóstico e diminui a sobrevida livre de doença e a sobrevida global de pacientes com câncer de mama (Anonymus 1990; COTE et al. 1999; YOSHIHISA et al. 2002). Sendo assim, é necessário um estudo em que a presença de metilação na região promotora do gene ADAM23 seja avaliada em um maior número de linfonodos sentinelas de pacientes com câncer de mama e que os resultados sejam associados à sobrevida das pacientes, a fim de comprovar os resultados obtidos neste estudo e de determinar o significado clínico e o valor prognóstico da presença de micrometástases e de células isoladas de tumor identificadas através da detecção de ADAM23 hipermetilada nos linfonodos sentinelas.

Entretanto, não detectamos a presença de ADAM23 hipermetilada na região 2 em linfonodos de nenhuma das 8 pacientes que, além da região 1, apresentaram hipermetilação da ADAM23 na região 2 nos tumores primários de mama.

De acordo com o modelo de espalhamento da metilação de DNA proposto por TURKER (2002), sugerimos anteriormente que, em tumores de mama, a metilação do gene ADAM23 começa na ilha de CpG 1 e se espalha ao longo do promotor até atingir a ilha de CpG 2, próxima ao sítio de início de transcrição, resultando no completo silenciamento do gene ADAM23. Este evento provavelmente ocorre no tumor primário e a ausência de expressão do gene ADAM23 favorece a migração das células tumorais e a invasão do tecido adjacente. Entretanto, ao atingir um novo sítio, as células tumorais precisam se fixar no tecido, a fim de proliferarem e sobreviverem em um sítio secundário de tumor. Nesta situação, moléculas de adesão auxiliam na fixação ao novo tecido, bem como no agrupamento das próprias células do tumor entre si, evitando que elas se desprendam e morram. É possível que ao atingirem o sítio secundário, as células tumorais sofram uma reorganização de seu genoma. Ao contrário das modificações genéticas, alterações epigenéticas são reversíveis, de modo que genes antes expressos podem ser silenciados e genes que estavam silenciados podem ser re-expressos. Neste contexto, a restauração da expressão do gene ADAM23 pode facilitar a adesão celular e, portanto, favorecer a sobrevivência do tumor no novo sítio. Para isto, ao atingirem os linfonodos, é possível que algumas células tumorais percam aleatoriamente a hipermetilação de dinucleotídeos CGs na região promotora do gene ADAM23 e que isto facilite sua sobrevivência. Provavelmente, a reversão do processo de hipermetilação de promotores gênicos ocorre no sentido oposto ao de seu estabelecimento, ou seja, das

regiões mais próximas ao sítio de início de transcrição (região 2 da ADAM23), em direção às regiões mais distantes, dispostas nas proximidades das regiões densamente metiladas (região 1 da ADAM23). Isso explicaria o resultado observado em nosso estudo de células tumorais metastáticas nos linfonodos não apresentarem a região 2 do gene ADAM23 hipermetilada em pacientes cujo tumor primário de mama apresentou hipermetilação na região 2. Nestas pacientes, provavelmente durante a colonização do linfonodo, a região 2 do gene ADAM23 foi inicialmente desmetilada nas células tumorais, e a região 1 permaneceu hipermetilada.

Em resumo, propomos que durante o desenvolvimento de um tumor surgem células individuais com diferentes graus de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23. As células que possuem alelos com a maior densidade de CGs metilados e, portanto, menor expressão de ADAM23, são as que apresentam o maior potencial para dissociar do tumor primário, invadir o tecido adjacente e atingir um novo sítio. A fim de garantir sua sobrevivência no novo tecido hospedeiro, as células tumorais precisam restaurar parcialmente a expressão de genes associados à adesão celular, como a ADAM23, facilitando a adesão entre as células do tumor.

Um processo semelhante já foi demonstrado para o gene E-caderina, importante para a adesão celular entre as células epiteliais. GRAFF et al. (2000) verificaram que a perda de expressão de E-caderina é heterogênea em tumores primários de mama em diferentes etapas da progressão tumoral e que isto está associado a um perfil de metilação bastante variável na região promotora deste gene. A metilação do promotor de E-caderina e seu silenciamento tem início nos carcinomas ductais *in situ* de mama e permanece durante a progressão maligna do tumor, podendo ser detectada nos carcinomas ductais invasivos e em metástases

linfonodais. Durante todas as etapas do desenvolvimento tumoral, foram observadas variações alelo-específicas do perfil de metilação do promotor gênico, o que se refletiu em perda de expressão heterogênea. Em linhagens tumorais de mama, as variações alelo-específicas do perfil de metilação do promotor de E-caderina sofreram a influência do microambiente tumoral. Em ensaios de invasão *in vitro*, favorecida pela diminuição da expressão de E-caderina, foi observado aumento da metilação. Utilizando modelos de crescimento tridimensional de tumor *in vivo*, linhagens tumorais de mama apresentaram uma diminuição da metilação do gene E-caderina e aumento de sua expressão, o que favorece adesão entre as células. Outros autores também já demonstraram que a diminuição da expressão de E-caderina em tumores de mama invasivos é restaurada em metástases (OKA et al. 1993; MAREEL et al. 1995; ST CROIX e KERBEL 1997).

Os resultados do nosso estudo demonstram que a presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 é um fator independente de pior prognóstico para pacientes com câncer de mama. Entretanto, para sua utilização na rotina clínica, estes resultados precisam ser validados em um grupo maior de pacientes com câncer de mama. Uma maneira de realizar a validação é analisar a expressão da proteína ADAM23, empregando a técnica de imunohistoquímica, que permite a análise de um grande número de amostras em pouco tempo. Entretanto, para isto são necessários anticorpos monoclonais anti-ADAM23, que não estão disponíveis comercialmente no momento.

Além disso, demonstramos que a presença de hipermetilação no gene ADAM23 pode ser utilizada como marcador molecular para detecção de células tumorais metastáticas em linfonodos de pacientes com câncer de mama, oferecendo

uma forma alternativa de alta sensibilidade e especificidade à tradicional prática histo-patológica de avaliação do status linfonodal. Eventualmente, esta metodologia poderá ser empregada em pacientes consideradas livres de comprometimento linfonodal pela avaliação histo-patológica, a fim de identificar a presença de micrometástases ou células tumorais isoladas nos linfonodos destas pacientes e reduzir as chances de resultados falso-negativos. Para confirmar estes resultados, a análise de metilação precisa ser ampliada para um maior número de linfonodos de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Eventualmente, outros marcadores moleculares de detecção de micrometástases também poderão ser empregados, para validar os resultados obtidos.

Atualmente, há uma grande necessidade de identificação de novos marcadores moleculares com valor prognóstico, capazes de predizer com acuidade a evolução clínica das pacientes com câncer de mama. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avaliou se a presença de hipermetilação no promotor de um gene específico associado ao câncer de mama no tecido linfonodal poderia ser utilizada para diagnosticar a presença de células metastáticas tumorais em linfonodos de pacientes com tumor de mama, oferecendo um marcador de prognóstico. Certamente, a utilização de um painel de genes que sofrem hipermetilação em câncer de mama representaria uma ferramenta molecular de detecção de metástases em linfonodos mais precisa do que o emprego de apenas um gene individualmente. É necessário, portanto, a identificação de novos genes que, em conjunto com a ADAM23, ofereçam um método alternativo à análise histo-patológica de alta especificidade e precisão para a detecção de metástases linfonodais em pacientes

com câncer de mama, a fim de identificar as pacientes sem comprometimento linfonodal pela patologia que sofrem recidivas e morrem em decorrência da doença.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. A presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 em tumores primários de mama é um fator independente de pior prognóstico, influenciando tanto a sobrevida livre de metástase a distância, como a sobrevida global específica em 5 anos.
2. A presença de hipermetilação no gene ADAM23 pode ser detectada em plasma de pacientes diagnosticadas com tumor de mama. Entretanto, sua ocorrência não influencia as taxas de sobrevida livre de metástases à distância e sobrevida global específica em 5 anos das pacientes.
3. A ocorrência de hipermetilação no promotor do gene ADAM23 pode ser utilizada para detectar a presença de células tumorais metastáticas em linfonodos de pacientes com câncer de mama, oferecendo um método alternativo à análise histo-patológica extremamente sensível e específico de detecção de metástases linfonodais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymus] Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers, International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. **Lancet** 1990; 335:1565-8.

Aarsvold JN, Alazraki NP. Update on detection of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer. **Semin Nucl Med** 2005; 35:116-28.

Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. **JAMA** 1996; 276:1818-22.

Anker P, Mulcahy H, Chen Xq, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:65-73.

Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? **Int J Cancer** 2003; 103:149-52.

Barnwell JM, Arredondo MA, Kollmorgen D, et al. Sentinel node biopsy in breast cancer. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:126-30.

Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet** 2000; 16:168-74.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** 2002; 16:6-21.

Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. **Cell** 1999; 98:387-96.

Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr Opin Cell Biol** 1998; 10:654-9.

Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. **Curr Top Microbiol Immunol** 1996; 213:123-61.

Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. **Cell** 1991; 64:1123-34.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile cancer. **Cancer** 1977; 39:456-61.

Cal S, Freije JMP, López JM, et al. ADAM23/MDC3, a Human Disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha v \beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol Biol Cell** 2000; 11:1457-69.

Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 abd p16), DAPKI, CDH1 and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 173:31-7.

Cavalli LR, Urban CA, Dai D, et al. Genetic and epigenetic alterations in sentinel lymph nodes metastatic lesions compared to their corresponding primary breast tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 146:33-40.

Chen Xq, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma in serum DNA patients diagnosed with breast cancer. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2297-303.

Coelho EC, Makdissi FBA. Detecção precoce do câncer de mama. In: Kowalski LP, Guimarães GC, Salvajoli JV, Feher O, Antonelli CBG, editores. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. São Paulo: Âmbito Editores; 2006. p.755-8.

Costa FF, Verbisck NV, Salim ACM, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene** 2004; 23:1481-8.

Costa FF, Colin C, Shinjo SMO, et al. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters** 2005; 380:260-4.

Couloundre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. **Nature** 1978; 274:775-80.

Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. **Lancet** 1999; 354:896-900.

Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. **Clin Biochem** 2004; 37:595-604.

Chu KU, Turner RR, Hansen NM, et al. Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? **Ann Surg** 1999; 229:536-41.

Dulaimi E, Hillinck J, Caceres II, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6189-93.

Ehrlich M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. **Nucleic Acids Res** 1982; 10:2709-21.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21:5400-13.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70.

Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol** 2002; 196:1-7.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol** 2003; 4:351-8.

Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. **Lancet** 2001; 357:1335-6.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancer from their normal counterparts. **Nature** 1983; 301:89-92.

Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:1853-8.

Fisher B, Gebhardt MC. The evolution of breast cancer surgery: past, present and future. **Semin Oncol** 1978; 5:385-94.

Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al. **AJCC-American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. Breast; p.171-80.

Fox JW, Bjarnason JB. The reprotlysins: a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases. In: Hooper N, editor. **Zinc metalloproteases in health and disease**. London: Taylor & Francis; 1995. p.47-82

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res** 1983; 11:6883-94.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Gimbergues P, Dauplat MM, Cayre A, et al. Correlation between molecular metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients and St Gallen risk category. **Eur J Surg Oncol** 2007; 33:16-22.

Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:2345-50.

Goessl C, Krause H, Muller M., et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. **Cancer Res** 2000; 60:5941-5.

Goldsmith AP, Gossage SJ, French-Constant C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. **J Neuroscience Res** 2004; 78:647-58.

Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. **Ann Oncol** 2000; 11:1097-104.

Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5'CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Res** 1995; 55:4531-5.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, et al. E-Cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. **Cancer Res** 1995; 55:5195-9.

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5'CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. **J Biol Chem** 2000; 275:2727-32.

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet** 1989; 83:155-58.

Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, et al. Identification of 27 5'CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. **Oncogene** 2004; 23:8705-10.

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

Hellman S. Karnofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers. **J Clin Oncol** 1994; 12:2229-34.

Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:9700-4.

Herman JG, Graff JR, Myohanem S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for metylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:9821-6.

Hibi K, Robinson CR, Booker S, et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. **Cancer Res** 1998; 58:1405-7.

Hoque MO, Feng Q, Toure P, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:4262-9.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Res** 2001; 61:1659-65.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007; 57:43-66.

Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1747-52.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genet** 1999; 21:163-7.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet** 1998; 19:187-91.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature** 2002; 3:415-28.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. **Cancer Res** 1997; 57:808-11.

Kawakami K, Brabender J, Lord RV, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1805-11.

Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenko VV. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. **Semin Cancer Biol** 2002; 449:1-16.

Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. **Surg Oncol** 1993; 2:335-9.

Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. **Clin Cancer Res** 2004; 10:28-32.

Laird PW. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. **Mol Med Today** 1997; 3:223-9.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature** 2003; 3:253-66.

Laird PW. Cancer epigenetics. **Hum Mol Genet** 2005; 1:R65-76

Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. **Int J Cancer** 2002; 100:542-8.

Lee YT. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. **J Surg Oncol** 1983; 23:175-80.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. **Cancer Res** 1977; 37:646-50.

Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. **Diagn Mol Pathol** 1996; 5:127-35.

Lipponen P, Saarelainen E, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen K. Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. **J Pathol** 1994; 174:101-9.

Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. **Ann NY Acad Sci** 2001; 945:1–7.

Lobanenkov VV, Nicolas RH, Plumb MA, Wright CA, Goodwin GH. Sequence-specific DNA-binding proteins which interact with (G+C)-rich sequences flanking the chicken *c-myc* gene. **Eur J Biochem** 1986; 159:181-8.

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, et al. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:6806-11.

Mareel M, Bracke M, Van Roy F. Cancer metastasis: negative regulation by an invasion-suppressor complex. **Cancer Detect Prev** 1995; 19:451-64.

McClelland M, Ivarie R. Asymmetrical distribution of CpG in an 'average' mammalian gene. **Nucleic Acids Res** 1982; 10:7865-77.

Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat Med** 1995; 1:686-92.

Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa de incidência e mortalidade de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2006: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. **Ann Surg** 1991; 214:491-9.

Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. **Cancer Res** 2003; 63:7641-5.

Nawroz-Danish H, Eisenberger CF, Yoo GH, et al. Microsatellite analysis of serum DNA in patients with head and neck cancer. **Int J Cancer** 2004; 111:96-100.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5'CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Res** 2000; 60:4346-48.

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. **Nature Genet** 1999; 23:58-61.

Nissan A, Jager D, Roystacher M, et al. Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. **Br J Cancer** 2006; 94:681-5.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. **Cancer Res** 1993; 53:1696-701.

Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, et al. Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. **Oncol Rep** 2000; 7:561-6.

Ouellette RJ, Richard D, Maïcas E. RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. **Am J Clin Pathol** 2004; 121:637-43.

Patel A, Groopman JD, Umar A. DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 983:286-97.

Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet** 2000; 16:83-7.

Rawlings ND, Barret AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods Enzymol** 1995; 248:183-228.

Reynolds C, Mick R, Donohue JH, et al. Sentinel lymph node biopsy with metastasis: can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? **J Clin Oncol** 1999; 17:1720-26.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6:597-610.

Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin alpha V beta 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:9482-7.

Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J** 1998; 334:93-8.

Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene** 1999; 236:79-86.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCRproducts separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques** 1994; 5:914-21.

Schlöndorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J Cell Science** 1999; 112:3603-17.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev** 2003; 17:7-30.

Semb H, Christofori G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. **Am J Hum Genet** 1998; 63:1588-93.

Shinozaki M, Hoon DSB, Giuliano AE, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2156-62.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:210-9.

Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. **Cancer Res** 1999; 59:3251-6.

Silva JM, Silva J, Sanchez A, et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3761-6.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N Engl J Med** 2001; 344:783-92.

Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classificação de tumores malignos. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores de mama; p.137-48.

Song F, Simth JF, Kimura MT, et al. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:3336-41.

St Croix B, Kerbel RS. Cell adhesion and drug resistance in cancer. **Curr Opin Oncol** 1997; 9:549-56.

Steeg PS. Control of invasion and metastasis. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne OK, editors. **Diseases of the breast**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2004. p.457-72.

Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. **Genome Res** 2002; 12:543-54.

Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. **Oncology** 1989; 46:318-22.

Styblo MT, Wood WC. Traditional prognostic factors for breast cancer. In: Bland KI, Copeland III EM, editors. **The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases**. Philadelphia: W B Saunders; 1998. p.419-25.

Sun YP, Deng KJ, Wang F, et al. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene** 2004; 325:171-8.

Takada H, Imoto I, Tsuda H, et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene** 2005; 24:8051-60.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science** 1991; 251:1451-5.

Tate PH, Bird A. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. **Curr Opin Genet Dev** 1993; 3:226-31.

Tavassoéli FA, Devilee P. **Tumours. pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press; 2003. (IARC WHO Classification of Tumours, N° 4)

Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. **Oncologie** 2003; 26:438-45.

Turker MS. Gene silencing in mammalian cells and the spread o DNA methylation. **Oncogene** 2002; 21:5388-93.

van de Vijver MJ, He JD, van't Veer LJ, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Eng J Med** 2002; 347:1999-2009.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-6.

VanPoznak C, Seidman AD. Breast cancer. In: Bertino JR, editor. **Encyclopedia of cancer**. Amsterdam: Academic Press; 2002. p.287-99.

Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. **Br J Haematol** 1994; 96:774-9.

Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol** 2002; 3:755-63.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, et al. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. **Nat Genet** 1999; 23:62-6.

Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet** 2005; 365:671-9.

Weigelt B, Verduijn P, Bosma AJ, et al. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. **Br J Cancer** 2004; 90:1531-37.

Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. **Oncogene** 2002; 21:5462-82.

Widschwendter M, Jiang G, Woods C, et al. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. **Cancer Res** 2004; 64:4472-80.

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:598-606.

Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin and Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol** 1995a; 131:275-8.

Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, et al. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Dev Biol** 1995b; 169:378-83.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet** 1997; 13:335-340.

Yoshihisa U, Yasuyo O, Yoshiatsu S, et al. Clinical significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes in “node-negative” breast cancer patients. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:965-8.

Felicia Peterson Cavalher
CAVALHER, FP

CURRICULUM VITAE

Julho/2007

CURRICULUM VITAE

Julho/2007

DADOS PESSOAIS

Nome Felicia Peterson Cavalher
Data de Nascimento: 24/02/1983
Juiz de Fora – MG – Brasil

Endereço profissional
Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
Laboratório de Biologia Molecular e Genômica
Hospital Alemão Oswaldo Cruz
Rua João Julião, 245 - 1º andar
01323 – 903 São Paulo – SP
e-mail para contato : fcavalher@ludwig.org.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2005 - 2007 Mestrado em Oncologia.
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, Brasil
Título: Caracterização do gene ADAM23 como um novo marcador molecular de prognóstico em câncer de mama
Orientador: Anamaria Aranha Camargo
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#05/51881-0)
- 2001 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Função das Glutarredoxinas sobre a atividade do Proteassoma 20S: implicações na regulação redox intracelular
Orientador: Marilene Demasi
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2006 - 2006 Curso de curta duração em Treinamento BD FACSCalibur.
BD Biosciences Centro de Treinamento, BD, Brasil
- 2006 - 2006 Curso de curta duração em Improving Recombinant Protein Expression in Bact..
Merck Biosciences S. A., MERCK S.A., Brasil, MERCK S.A., Brasil

IDIOMAS

Compreende	Inglês (Bem)
Fala	Inglês (Bem)
Lê	Inglês (Bem)
Escreve	Inglês (Bem)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA FF, PAIXÃO VA, CAVALHER FP, RIBEIRO KB, CUNHA IW, RINCK JRJA, O'HARE M, MACKAY A, SOARES FA, BRENTANI RR, CAMARGO AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 2006; 165:135-43.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. COSTA FF, CAVALHER FP, PAIXÃO VA, GRANATO MF, IERARDI DF, CUNHA IW, RIBEIRO KB, LIMA VCC, CARVALHO AL, MACIEL MS, SOARES FA, CAMARGO AA. ADAM23 promoter hypermethylation as an independent prognostic factor in breast cancer.
In: **XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular/ IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/ IV International Symposium on Extracellular Matrix.** , 2006, Angra dos Reis - RJ - Brasil.
2. COSTA FF, PAIXÃO VA, CAVALHER FP, RIBEIRO KB, CUNHA IW, RINCK JRJA, O'HARE M, MACKAY A, SOARES FA, BRENTANI RR, CAMARGO AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer
In: **IV São Paulo Research Conference - Cancer today, from Molecular Biology to treatment.** , 2005, São Paulo – SP – Brasil.
3. CAVALHER FP, IERARDI DF, COSTA FF, KLASSEN G, CAMARGO AA. Expression pattern and methylation analysis of the promoter region of different ADAM family members in breast tumor.
In: **VIII Simpósio Internacional de Matriz Extracelular**, 2004, Angra dos Reis - RJ - Brasil.
4. CAVALHER FP, SILVA GM, DEMASI M, SOARES NETTO LE. Função das Glutarredoxinas sobre a atividade do Proteassoma 20S: Implicações na regulação redox intracelular.
In: **XXXII Congresso de Bioquímica e Biologia Celular**, 2003, Caxambu – MG – Brasil.