

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE p53 E p21 EM  
FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE**

**Lolita Schneider**

**Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas: Fisiologia

**Porto Alegre, 2007.**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, minha orientadora, pelo exemplo como pesquisadora, pela confiança, estímulo, tranqüilidade e pelos ensinamentos valiosos oferecidos ao longo deste trabalho de Mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Edison Capp, pelo apoio e auxílio no entendimento das técnicas laboratoriais e de pesquisa.

À Prof. Poli Mara Spritzer, pelo estímulo à pesquisa e pela colaboração.

Ao médico Rodrigo Cericatto, pelo apoio ao projeto de pesquisa, seleção das pacientes e coleta das amostras.

Aos médicos residentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que participaram dos procedimentos cirúrgicos.

À Gisele Branchini, pela amizade, pelo apoio e compreensão que sempre teve comigo e pela ajuda incondicional no desenvolvimento deste trabalho.

À Idelma, pela amizade e ajuda na preparação dos materiais do laboratório.

À Débora Martinho Morsch e Adriane Pozzobon, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

A todos os meus colegas de laboratório, que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para o sucesso desta conquista.

Aos meus pais, por terem proporcionado a mim uma vida cheia de amor e por terem sempre me encorajado nos momentos difíceis da minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Glândula Mamária.....	10
1.2 Fibroadenoma.....	13
1.3 Ciclo Celular.....	15
1.4 Gene <i>p53</i> .....	17
1.5 Gene <i>p21</i> .....	20
2. OBJETIVO.....	23
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	24
3.1 Delineamento do estudo.....	24
3.2 Pacientes.....	24
3.3 Coleta das amostras:.....	25
3.4 Análise da expressão gênica.....	26
3.5 Western blot.....	30
3.6 Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Análise dos níveis de mRNA do gene <i>p53</i> .....	39
4.2. Análise dos níveis protéicos da proteína <i>p53</i> .....	41
4.3. Análise dos níveis de mRNA do gene <i>p21</i> .....	43
4.4. Análise dos níveis protéicos da proteína <i>p21</i> .....	45
5. DISCUSSÃO.....	47

6. CONCLUSÃO .....	52
7. REFERÊNCIAS .....	53
ANEXO 1 .....	61
ANEXO 2 .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A<sub>260</sub>** – Absorbância a 260 nm  
**BSA** – Albumina sérica bovina  
**Cdk2** - Cinase dependente de ciclina 2  
**Cdk4** - Cinase dependente de ciclina 4  
**Cdkls** – Inibidor da cinase dependente de ciclinas  
**Cdks** - Cinases dependentes de ciclinas  
**cDNA** – Ácido desoxirribonucléico complementar  
**cm** – centímetro  
**DEPC** – Dietilpirocarbonato  
**DNA** – Ácido desoxirribonucléico  
**dNTPs** – Desoxinucleotídeos trifosfatados  
**DTT** – ditioneitol  
**EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético  
**g** - gravidade  
**HEPES** – N-[2-hidroxietil]piperazina]-N-[2-ácido etanosulfônico]  
**HCl** - ácido clorídrico  
**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
**KCl** - Cloreto de potássio  
**M** – Molar  
**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio  
**min** – minutos  
**mL** – mililitro  
**mM** – milimolar  
**mRNA** – Ácido Ribonucléico mensageiro  
**Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>** – Pirofosfato decahidrato de sódio  
**NaCl** - Cloreto de sódio  
**NaF** - Fluoreto de sódio  
**NaVO<sub>4</sub>** – Vanadato de sódio  
**NC** – Nitrocelulose  
**NET** - Tris, EDTA, NaCl  
**ng** - nanograma  
**nm** – nanômetro  
**PAAF** - Punção aspirativa por agulha fina  
**pb** – Pares de bases  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PKC** – Proteína Cinase C  
**PMA** – Potente ativador da PKC  
**PMSF** - Fenilmetilsulfonilfluoreto  
**RNA** – Ácido Ribonucléico  
**rpm** – rotações por minuto  
**RT-PCR** – Reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa  
**SDS** - sulfato dodecil de sódio

**SDS-PAGE** – Eletroforese de gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio

**s** – segundos

**UA** – unidades arbitrárias

**Tris**- Hidroximetil aminometano

**V** – Volts

**β<sub>2</sub>m**- Beta-microglobulina

**μg** – micrograma

**μL** – microlitro

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

**Tabela 2:** Condições para a PCR.

**Tabela 3:** Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Doenças da mama

**Figura 2.** Ciclo celular

**Figura 3.** Ciclo da divisão celular

**Figura 4.** Curva de ciclos para o gene *p53*

**Figura 5.** Curva de ciclos para o gene *p21*

**Figura 6.** Análise dos níveis de mRNA do gene *p53*

**Figura 7.** Análise dos níveis protéicos da proteína p53

**Figura 8.** Análise dos níveis de mRNA do gene *p21*

**Figura 9.** Análise dos níveis protéicos da proteína p21

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Glândula Mamária**

A glândula mamária é considerada uma glândula sudorípara modificada, de origem ectodérmica (Osborne, 1999), constituída por epitélio ductal e alveolar e estroma (tecido conjuntivo e adiposo) (Cotran e cols, 1989). O desenvolvimento da mama tem início durante a vida embrionária, mas seu desenvolvimento celular se completa no final da primeira gestação (Gompel e cols, 2001).

A mama é um órgão bilateral que sofre uma série de alterações durante o crescimento na infância, na puberdade, gestação, lactação e regressão na pós-menopausa, desde mudanças na sua forma, tamanho e funções (MacMahon e cols, 1970; Russo & Russo, 1987; Parker e cols, 1996; Russo & Russo, 1996).

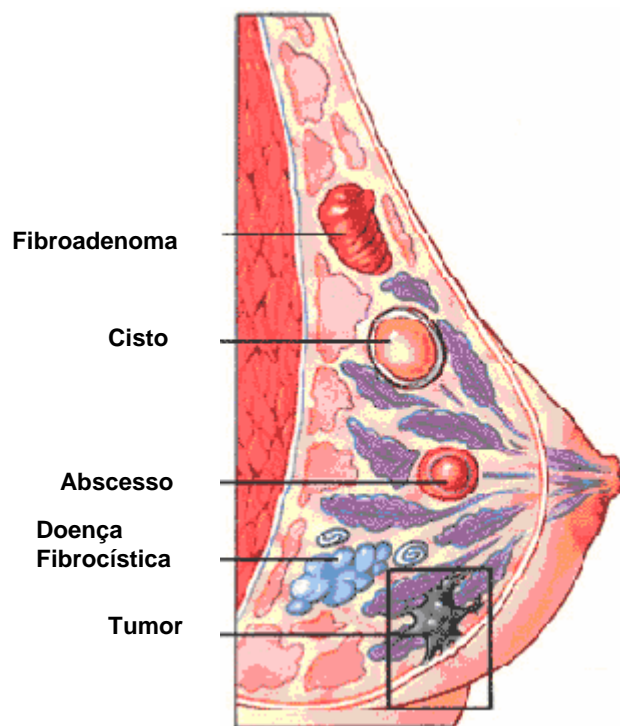
O desenvolvimento e funcionalidade das glândulas mamárias dependem de uma série de fatores genéticos, ambientais e hormonais (Gadow, 2004). Os principais eventos envolvidos no desenvolvimento da mama são proliferação, diferenciação e apoptose (morte celular), os quais são regulados, entre outros fatores, por hormônios gonadais (estrogênio e progesterona) (Gompel e cols, 2001). O estrogênio está envolvido no controle da proliferação e atua no

desenvolvimento da mama durante a puberdade (Gompel e cols, 2001). A progesterona está relacionada com o desenvolvimento lóbulo-alveolar na glândula mamária em preparação para a secreção de leite e na supressão da síntese de proteínas do leite antes do parto (Graham & Clarke, 1997).

A glândula mamária apresenta etapas cíclicas de proliferação, diferenciação e involução (Lydon e cols, 2000; Cericatto e cols, 2005). Durante a gestação, as secreções de estrogênio e progesterona aumentam, e há um aumento na síntese de DNA e também na diferenciação celular. Após a gravidez as células sofrem involução, um processo mediado por apoptose (Gompel e cols, 2001).

Alterações nas secreções de hormônios estimulantes e/ou inibidores da proliferação celular podem resultar em crescimento celular descontrolado, levando ao aparecimento de lesões proliferativas benignas ou malignas (Clemons & Goss, 2001) (Figura 1). Nos últimos anos, as doenças da mama, tanto benignas quanto malignas, têm despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa. A incidência das doenças benignas de mama geralmente não é bem estimada, pois não são sempre sintomáticas e a maioria das mulheres não tem acompanhamento médico regular. A estimativa é de que uma em cada duas mulheres desenvolve algum tipo de doença fibrocística de mama e que uma em cada cinco mulheres desenvolve fibroadenoma (Goehring & Morabia, 1997).

A análise das lesões mamárias benignas, comparada ao tecido mamário normal, representa um possível modelo de estudo para uma maior compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento destas lesões da mama (Cericatto e cols, 2005).



**Figura 1:** Doenças da mama.

Modificado de [www.ama-assn.org/ama/pub/category/7150.html](http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/7150.html)

## 1.2 Fibroadenoma

Dentre as lesões mamárias benignas destaca-se o fibroadenoma que é o tumor benigno de mama mais comum e ocorre em 25% das mulheres assintomáticas (Hasebe e cols, 1999; El-Wakeel & Umpleby, 2003). Sabe-se que 10 a 16% das pacientes podem apresentar fibroadenomas múltiplos e/ou bilaterais (Xavier e cols, 1996). O fibroadenoma se origina do estroma e do epitélio da unidade ducto-lobular. Na grande maioria das pacientes, o fibroadenoma ocorre em mamas de mulheres jovens e apresenta crescimento auto-limitado, podendo alcançar 2-3 cm de diâmetro, permanecendo inalterado ou apresentando regressão espontânea (Tobias e cols, 1999). O seu crescimento é lento, mas, na gestação, pode aumentar rapidamente de volume e sofrer infarto. Apresenta uma menor incidência na menopausa, onde costuma regredir de tamanho e endurecer devido à calcificação e à inoculação fibrosa (Tobias e cols, 1999).

Uma análise genética dos fibroadenomas demonstrou que as células epiteliais e estromais têm origem policlonal, confirmando tratarem-se de processos hiperplásicos (Noguchi e cols, 1993), diferentemente dos processos neoplásicos, que têm origem a partir de uma única célula precursora (monoclonal) (Alberts e cols, 2004).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos fibroadenomas não são completamente conhecidos (Courtilot e cols, 2005). Além do papel dos receptores de estrogênios e progesterona expressos por células epiteliais (Gompel e cols, 2001), estudos recentes descrevem o possível papel dos fatores de crescimento e seus receptores na patogênese de doenças benignas

da mama, incluindo fibroadenomas, sugerindo que múltiplas vias de sinalização podem estar envolvidas no crescimento e diferenciação das lesões benignas da mama (La Rosa e cols, 2001).

A relação entre fibroadenoma e câncer de mama ainda não está clara. Existem estudos epidemiológicos que mostram uma associação positiva do fibroadenoma com o risco de câncer de mama, enquanto que descrições feitas por Franco e colaboradores, indicam que não existe aumento neste risco (Franco e cols, 2001). Alterações genéticas, que estão mais freqüentemente envolvidas em carcinomas mamários, não estão presentes em fibroadenomas (Franco e cols, 2003). Alguns autores sugerem que as lesões encontradas dentro do fibroadenoma são, em sua grande maioria, lesões proliferativas intraductais. Estas lesões são consideradas fator de risco para o câncer de mama, não o fibroadenoma (Tobias e cols, 1999).

Além dos hormônios esteróides participarem do desenvolvimento da glândula mamária, eles também podem estar envolvidos na regulação do ciclo celular e alterar a transcrição gênica envolvida na regulação do ciclo celular mamário. A análise da expressão gênica envolvida na regulação do ciclo celular pode fornecer dados das interações dos hormônios esteróides com os demais fatores reguladores deste ciclo e da diferenciação celular.

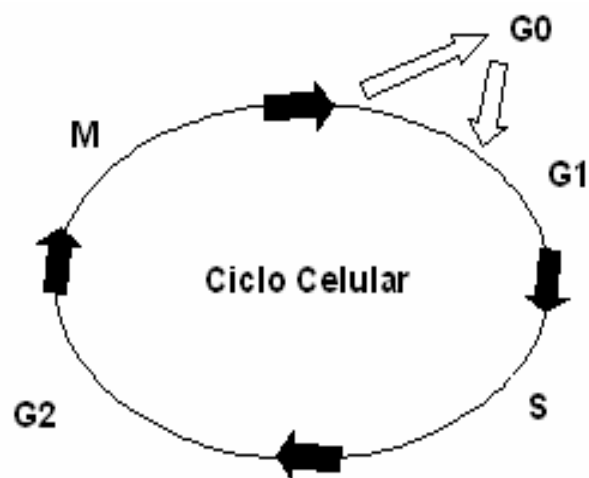
### 1.3 Ciclo Celular

O ciclo celular é um mecanismo de duplicação e divisão celular. Sua função é duplicar, com precisão, todo o conteúdo de DNA dos cromossomos e gerar cópias geneticamente idênticas. Este mecanismo apresenta duas fases principais, a fase S (S de síntese), onde ocorre a duplicação do DNA, e a fase M (M de mitose), que é a etapa da divisão celular. Para permitir um maior tempo de crescimento, existem as fases de intervalos extras, uma fase G<sub>1</sub>, entre a fase M e a fase S, e uma fase G<sub>2</sub>, entre a fase S e a fase M (Figura 2). Se as condições extracelulares não forem favoráveis à duplicação, as células atrasam o ciclo celular podendo entrar em um estado de inativação conhecido por G<sub>0</sub>, permanecendo por longos períodos de tempo, como dias, meses ou anos antes de continuar com a proliferação (Alberts e cols, 2004).

O ciclo celular é regulado por um mecanismo molecular complexo. Foi demonstrado que a regulação do ciclo celular é governada por subunidades catalíticas, conhecidas como cinases dependentes de ciclinas (Cdks), e subunidades regulatórias, conhecidas como ciclinas, as quais sofrem um ciclo de síntese e degradação a cada ciclo celular (Sherr, 1993). A progressão do ciclo celular é regulada por ativação ou inibição da fosforilação das subunidades Cdks. Diferentes estágios do ciclo apresentam pontos de controle (Draetta, 1990). Foram descritos mecanismos adicionais para inativação dos complexos Cdk, como as proteínas regulatórias, que ao se ligarem no complexo ciclina-Cdk podem inibi-lo (el-Deiry e cols, 1993). Quando as células são expostas a algum tipo de estresse, como agentes que podem danificar o DNA, ocorre uma regulação negativa no ciclo celular; as Cdks ativas são

inibidas por proteínas regulatórias que interrompem o ciclo celular em sua fase G1 ou G2, impedindo que a célula passe para a próxima fase antes que o seu DNA seja reparado (Cohen & Ellwein, 1990; Sherr & Roberts, 1995).

O controle do ciclo celular é muito importante na regulação do número de células nos tecidos do corpo. Quando o sistema apresenta uma falha, ocorrem divisões celulares excessivas, podendo levar a lesões proliferativas.



**Figura 2:** Principais fases do ciclo celular. As fases S (síntese), M (Mitose) e as fases de intervalos extras G1 e G2. Adaptado de Alberts e cols, 2004.



#### **1.4 Gene *p53***

O gene *p53* codifica uma fosfoproteína nuclear formada por 375 aminoácidos (Milner, 1997) que exerce um papel essencial na regulação do ciclo celular, especialmente na transição da fase G0 para G1 (Gompel e cols, 2001) Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 17 na posição p13.1 (Milner, 1997). Em 1979, foi feita a primeira descrição da proteína p53, quando encontrada em células alteradas pelo vírus símio SV40, associado ao antígeno T (Lane & Crawford, 1979). Durante os anos 70, o gene *p53* foi inicialmente visto como um oncogene e, por volta de 1990, foi amplamente reconhecido como gene supressor de tumor, estando mutado ou deletado em torno de 50% em todas as neoplasias humanas (Levine, 1997; Hofseth e cols, 2004).

No interior da célula a proteína p53 normalmente se encontra em baixa concentração por apresentar uma meia-vida curta, aproximadamente 20 minutos (Reihnsaus e cols, 1990). Em algumas células p53 pode estar na forma inativa, e vai depender de um estímulo, um sinal, para que a sua função seja ativada (Levine, 1997). São vários os eventos que podem levar à ativação de p53, como, por exemplo, um dano no DNA (Levine, 1997). A inativação de p53 resulta em instabilidade genômica (Stewart & Pietenpol, 2001).

A proteína p53 é considerada uma das proteínas mais importantes para manter a estabilidade e integridade do genoma. Ela protege a célula, impedindo a proliferação celular após um dano no DNA e ativando a apoptose, no caso de um dano irreparável (Osin & Lakhani, 1999; Borresen-Dale, 2003).

Indivíduos que são heterozigotos para o alelo *p53* desenvolvem câncer com uma frequência muito alta. A distribuição de células e tecidos tumorais, como os de sarcomas, de mamas e de adrenal não é aleatória, e não está claro o que isto significa, se a função de *p53* ou mutações neste gene são necessárias para o desenvolvimento de câncer em uma célula heterozigota (Kemp e cols, 1993).

A proteína *p53* selvagem é expressa em níveis baixos nas células normais, ao contrário da proteína mutada que apresenta alta expressão e uma meia vida mais longa (Reich e cols, 1983). Em células não estressadas, os níveis dessa proteína são mantidos muito baixos em consequência de uma interação com a proteína Mdm-2 (Lain e cols, 1999; Tao & Levine, 1999). Estudos sugerem que uma expressão aumentada da proteína Mdm-2 pode resultar em transformação celular, pelo menos em parte, por controlar *p53* que apresenta propriedades para regular o crescimento (Finlay, 1993).

Quando ocorrem mutações no gene *p53*, as células que apresentam DNA danificado não são reparadas ou destruídas, resultando na incapacidade de interromper o ciclo celular ou desencadear a apoptose, permitindo o surgimento de células malignas. Além disso, a proteína mutada pode interagir com a proteína selvagem impedindo que ela cumpra sua função normal; esta ação é denominada de efeito dominante negativo, pois a mutação de um dos alelos leva à supressão do alelo normal (Harris & Hollstein, 1993; Milner, 1997). Mutação em *p53* é uma das causas da Síndrome de Li-Fraumeni, uma forma rara de câncer hereditário. Esta é uma doença autossômica dominante que se caracteriza pela predisposição a neoplasias em diferentes tecidos do corpo (Li e cols, 1988).

Em um estudo com amostras de lesões benignas de mama, incluindo fibroadenoma, nenhuma mutação foi encontrada no gene *p53*, mas um caso de fibroadenoma apresentou um polimorfismo no códon 213 do exon 6. Este polimorfismo foi encontrado nos dois componentes celulares do fibroadenoma, no epitélio e no estroma, e também no tecido normal adjacente (Franco e cols, 2001).

Desde a descoberta da proteína *p53* como uma seqüência específica de fator de transcrição, têm sido identificados muitos genes e vias reguladas por esta proteína. A interrupção do crescimento celular mediado por *p53* resulta da transativação de *p21* dependente de *p53* (el-Deiry e cols, 1993).

Nos cânceres em que *p53* selvagem é expresso, é possível que alterações em *p21* possam ter o mesmo efeito que uma perda da função de *p53*, isto é, perda da capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G1 (Shiohara e cols, 1994; Li e cols, 1995; Mousses e cols, 1995).

## 1.5 Gene *p21*

O gene *p21* codifica uma cinase inibidora dependente de ciclina (CdkI) que atua na regulação do ciclo celular. A proteína codificada (21 KDa) se liga nos complexos ciclina-Cdk2 ou -Cdk4 inibindo a atividade destes complexos, funcionando como um regulador da progressão do ciclo celular em G1, promovendo a interrupção da síntese de DNA e levando à parada do ciclo celular. Esta proteína pode desempenhar um papel regulatório na fase S da duplicação celular e no reparo do DNA (Gompel e cols, 2001) (Figura 3).

O gene *p21* apresenta sítios de ligação para p53, indicando que a transcrição do *p21* é diretamente regulada por p53 (Haendler e cols, 1987; Lee e cols, 1995). Em resposta a um dano no DNA, p53 induz a expressão do *p21* que interrompe o avanço do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S por inibição das Cdk's (el-Deiry e cols, 1993; el-Deiry e cols, 1994).

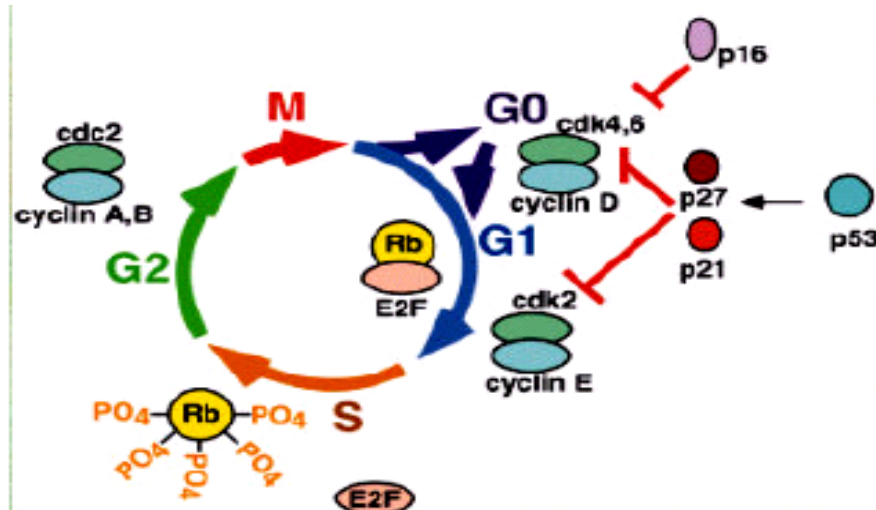
Vários outros fatores também podem induzir a expressão do *p21* e bloquear o ciclo celular por vias independentes de p53 (Somasundaram e cols, 1997). *p21* é uma proteína chave para determinar se a célula prolifera ou se diferencia (Steinman e cols, 1994). Sheikh e colaboradores demonstraram, em um estudo feito com células de câncer de mama, que os mecanismos que regulam a expressão do *p21* envolvem vias de sinalização dependentes e independentes de p53 (Sheikh e cols, 1994). Em células de câncer de ovário humano, foi demonstrado que a indução da expressão do *p21* pode ocorrer por ativação da proteína cinase C (PKC) em células que não apresentam p53. Este estudo também sugere que o aumento da expressão do *p21* pode ser devido à

ação de um potente ativador da PKC (PMA), que ocorre principalmente em nível pós-transcricional (Akashi e cols, 1999).

As alterações mais comuns encontradas em câncer humano são a inativação ou mutação em um gene supressor de tumor, como *p53*, e uma dramática redução dos níveis do *p21*, como revisado anteriormente (Ostrakhovitch & Cherian, 2004).

Foi demonstrado que a expressão de *p21* está associada com a presença de metástases e, provavelmente, com grande instabilidade genética (Ceccarelli e cols, 2001). Outro estudo indicou uma associação entre redução/ausência de *p21* e o desenvolvimento de metástases (Bukholm & Nesland, 2000). Estes resultados nos levam a acreditar que o papel de *p21* no desenvolvimento de metástases ainda não está claro.

Nas células prostáticas, a expressão do *p21* pode ser aumentada pela ação direta do *p53* (Macleod e cols, 1995), dos androgênios (Lu e cols, 1999; Ling e cols, 2001) e também pode ser desencadeada por fatores de crescimento (Robson e cols, 1999).



**Figura 3:** Ciclo da divisão celular representando a ação de p53 sobre a transativação de p21 e este agindo sobre as Cdks, interrompendo o ciclo na fase G1. Adaptado de Lewin, 2000.

Este estudo tenta buscar um melhor entendimento dos processos envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose do tecido mamário normal e dos fibroadenomas. O desenvolvimento do fibroadenoma está sob a influência de um complexo sistema de controle influenciado por fatores hormonais e genes que regulam o ciclo celular. Uma análise da expressão gênica e protéica envolvida na regulação do ciclo celular pode fornecer dados para ajudar a esclarecer o desenvolvimento destes dois tecidos em estudo.

## **2. OBJETIVO**

Determinar os níveis do mRNA e das proteínas p53 e p21 em fibroadenomas, em comparação com o tecido mamário normal adjacente de mulheres em idade reprodutiva.

## **3. PACIENTES E MÉTODOS**

### **3.1 Delineamento do estudo**

O presente estudo é um estudo transversal.

### **3.2 Pacientes**

Foram convidadas a participar do estudo todas as pacientes atendidas pelo Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com procedimento cirúrgico agendado por nódulos mamários, sugestivos de fibroadenoma, no período de março de 2005 a dezembro de 2006.

#### **3.2.1 Critérios de inclusão:**

- pacientes com nódulos sugestivos de fibroadenoma (doença benigna);
- os nódulos mamários devem ter sido avaliados clinicamente, por exames de imagem (eco e/ou mamografia) e/ou por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), e ter seu diagnóstico de fibroadenoma comprovado por exame anátomo-patológico;
- mulheres na menacme (período reprodutivo);



- informações sobre os antecedentes gineco-obstétricos disponíveis, incluindo a data da última menstruação e tipo de método anticonceptivo em uso.

### **3.2.2 Critérios de exclusão:**

- pacientes que ao exame anátomo-patológico não tenham confirmado a impressão pré-operatória de fibroadenoma;
- mulheres no período pré ou pós-menopáusico;
- mulheres na menacme, mas em amenorréia (ausência de menstruação).

### **3.3 Coleta das amostras:**

As pacientes selecionadas foram submetidas a um recordatório (em consultório, anteriormente à cirurgia) para obtenção de dados antropométricos e de história ginecológica e obstétrica (Anexo 1). Também foi solicitado seu consentimento livre e esclarecido para participação no estudo (Anexo 2).

Foram analisadas 14 pacientes neste estudo, as quais foram atendidas no Serviço de Mastologia do HCPA. As amostras foram coletadas no centro cirúrgico onde as pacientes foram submetidas à remoção cirúrgica de nódulos sugestivos de fibroadenomas. Foram obtidos fragmentos da área central do fibroadenoma e de tecido mamário normal adjacente, separados pelo cirurgião responsável que participou deste estudo, e o restante do material foi encaminhado ao exame anátomo-patológico. Os fragmentos destinados à análise da expressão gênica no

tecido foram devidamente identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e transferidos para um freezer a -80°C para posterior extração de RNA total. O diagnóstico de fibroadenoma foi baseado no exame anátomo-patológico.

Os fragmentos cirúrgicos, destinados à pesquisa foram devidamente identificados (N=tecido mamário normal adjacente e F=fibroadenoma), e submetidos de forma individualizada aos processos de extração do RNA total, síntese de cDNA e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos para determinação dos níveis de mRNA dos genes *p53* e *p21*, e análise de proteína, conforme descrição resumida a seguir.

### **3.4 Análise da expressão gênica**

#### **3.4.1 Extração do RNA total:**

O RNA total dos fragmentos do fibroadenoma e do tecido mamário normal adjacente foi extraído de acordo com o Método da Guanidina Tiocianato, com uso da solução “D” (Chomczynski & Sacchi, 1987). O fragmento de tecido, após congelamento, foi colocado em um tubo de vidro (5 mL) com 1 mL de solução “D” e homogeneizado. Foi acrescentado 50 µL de acetato de sódio 2M pH 4,0 e agitado por inversão. Foi adicionado 0,5 mL de Fenol pH 5-6 e agitado por inversão. Adicionado 0,1mL de clorofórmio-isoamílico (49:1) no mesmo tubo, agitado vigorosamente por 10 seg seguido de banho de gelo por 15 min. Foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, adicionado 1 mL de isopropanol e colocado a -20°C, no mínimo por

1 h. Passado o tempo de 1 h, o material foi centrifugado por 15 min a 12.000 rpm a 4°C, descartado o sobrenadante, e o pellet foi dissolvido com 0,3 mL de solução “D”. Foi adicionado 1 volume de isopropanol, precipitado *overnight* a -20°C, e após, o precipitado foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o RNA precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado por 8 min a 10000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*), incubado por 10 min a 65°C e depois colocado em banho de gelo durante 1 min para posterior quantificação das amostras e estocagem a -20°C.

### **3.4.2 Quantificação do RNA**

O precipitado de RNA foi diluído em 12-20 µL de água com DEPC. Para a quantificação, alíquotas de 1 µL da solução de RNA das amostras foram diluídas em 499 µL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Onde: A= absorvância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação.

Por exemplo, para 1 µL da solução de RNA em 500 µL de água.

D = 1: 499 = 500 vezes

### **3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa - RT-PCR**

#### **Síntese do cDNA**

A partir do RNA total, a expressão do mRNA específico para os fatores em estudo também foi avaliada indiretamente, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente, RT-PCR (Brum e cols, 2003). A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 2 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estimou-se que 2 µg de RNA total dariam origem a 40 ng de cDNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 min juntamente com o *primer* e os dNTPs. Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM 10 mM e DTT 0,1M, sendo incubado por 2 min a 42°C. Em seguida foi incubado com a enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 min. Após nova desnaturação a 70°C por 15 min, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 23 µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

#### **Protocolo Geral da PCR**

As reações de PCR foram feitas num volume final de 50  $\mu$ L. As amostras de cDNA (2  $\mu$ L, correspondentes a aproximadamente 4 ng de cDNA) foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 2 min na presença de 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) mais 500 mM KCl e 50mM MgCl<sub>2</sub>. Esse procedimento, conhecido como *hot start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados. Em seguida os tubos foram imersos em gelo e receberam 10  $\mu$ L de uma solução com as mesmas concentrações do tampão Tris-HCl e MgCl<sub>2</sub>, acrescida dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA Polimerase e submetidos à amplificação. A tabela 1 mostra as características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA (beta-microglobulina- $\beta_2m$ , para *p21* e *p53*). As condições finais para PCR estão listadas na tabela 2. O número de ciclos foi ajustado para cada oligonucleotídeo (Figura 4 e 5). Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen (*SuperScript<sup>®</sup> Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*). O produto amplificado pela PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica através do sistema de captação de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Para cada amostra, a análise densitométrica obtida para a banda referente ao *p21* e ao *p53*, respectivamente, foi corrigida pela banda referente ao gene constitutivo  $\beta_2m$ , sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

### **3.5 Western blot**

#### ***3.5.1 Extração de Proteínas***

Aproximadamente 0,2 gramas de tecido foram homogeneizados individualmente em um homogeneizador por 30 s em velocidade 3, a 4°C na presença de 500 µL de uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e 2 mM de NaVO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100. O material foi solubilizado por no mínimo 16 h a 4°C, após foi centrifugado durante 30 min a 4°C em velocidade de 12000 x g. Foi realizada a dosagem de proteínas do sobrenadante através do método de Bradford (Bradford, 1976).

#### ***3.5.2 Análise de proteínas***

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 10 a 15% (Orcy e cols, 2005). Aproximadamente 30 µg de proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a 95°C por 10 min (Laemmli, 1970), e colocadas em cada poço. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 10% metanol, pH 8,3). A transferência foi efetuada por 1 h e 30 min, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 80 V.

As membranas de nitrocelulose (NC) foram então incubadas durante 1 h em solução bloqueadora (NET), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de 2% BSA. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo específico anti-p53 (Chemicon) e anti-p21 (Upstate Biotechnology) diluídos em NET. Após a incubação, as membranas foram lavadas com NET (5 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 1 hora. Para o anti-p53 foi utilizado o anticorpo imunoglobulina-G de cabra anti-coelho e para o anti-p21 foi utilizado o anticorpo imunoglobulina-G de cabra anti-camundongo, ambos conjugados com a enzima *horseradish peroxidase* (Santa Cruz Biotechnology). Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente com NET sem Tween 20 (5 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência (ECL) por 1 min.

**Revelação das Autorradiografias:** Após a incubação com solução para quimio-luminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (*High Performance chemiluminescence Film – Amersham*) durante

1-5 min. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, seguiram-se a visualização e a análise dos resultados. A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (Image-Master VDS Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas de p21 e p53 foi corrigida por uma banda inespecífica obtida pela coloração com *Red Ponceau S*, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

### **3.6 Análise Estatística**

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo anterior do mesmo grupo de pesquisa (Cericatto e cols, 2005), considerando-se um poder de 90%, nível de significância de 0,05 e diferença entre as médias de 0,5. O cálculo amostral foi baseado em dados de expressão gênica, cujo N necessário é de 14 pacientes em cada grupo. Para cada amostra, os resultados foram representados como média  $\pm$  desvio padrão da média, tanto para o tecido mamário normal quanto para os fibroadenomas. Os resultados de expressão gênica e protéica foram avaliados quantitativamente e apresentaram distribuição normal, portanto, foi utilizado o teste t de Student para amostras emparelhadas (entre grupo normal e fibroadenoma, para cada paciente). O teste foi usado independentemente para os dados referentes aos genes e às proteínas, p21 e p53, respectivamente. Foi considerado o nível de significância quando  $P < 0,05$ . Todas as análises foram feitas



utilizando-se o processador de dados SPSS (*Statistical Packages for the Social Sciences*).

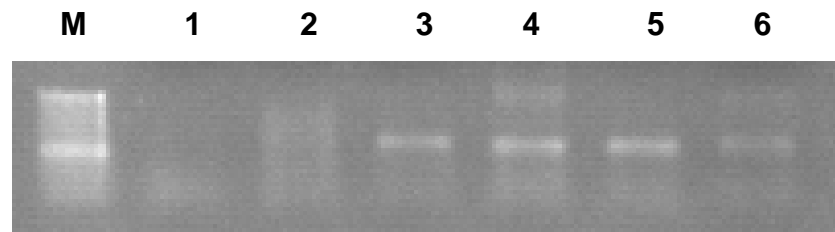
**Tabela 1** - Características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Sequência sintetizada	Fragmento	Referência
<i><b><math>\beta_2m</math></b></i>			
<i>sense</i>	5"CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	165 pb	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
<i>antisense</i>	5"ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'		
<i><b>p21</b></i>			
<i>sense</i>	5'CTCAG7AGGAGGCGCCATG 3'	517 pb	(Robson e cols, 1999)
<i>antisense</i>	5' GGGCGGATTAGGGCTTCC 3'		
<i><b>p53</b></i>			
<i>Sense</i>	5'AGGTGACCCAGGCTTGGAAAG 3'	133pb	(Sundfors & Collan, 1997)
<i>antisense</i>	5'TCCTGACTCAGAGGGGGGCTC 3'		

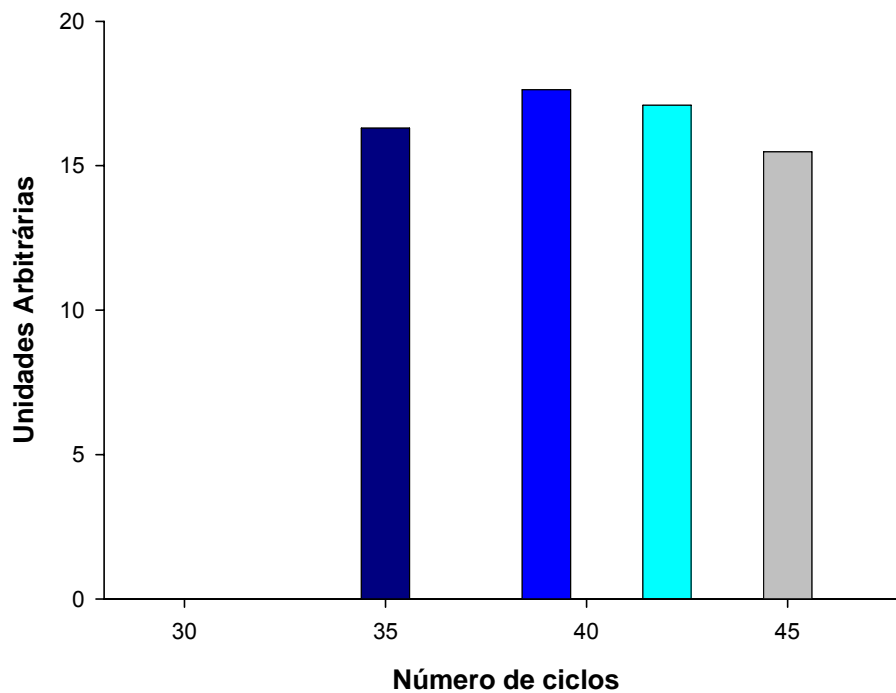
**Tabela 2 – Condições para a PCR**

<b>Gene</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Extensão Final</b>
<b><i>p53</i></b>	94°C / 1min	56°C / 1min	72°C / 1min	35 ciclos	72°C / 5min
<b><i>p21</i></b>	94°C / 1min	57°C / 50seg	72°C / 1min	30 ciclos	72°C / 5min
<b><i><math>\beta_2m</math></i></b>	94°C / 30seg	55°C / 30seg	72°C / 1min	30 ciclos	72°C / 5min

**A**



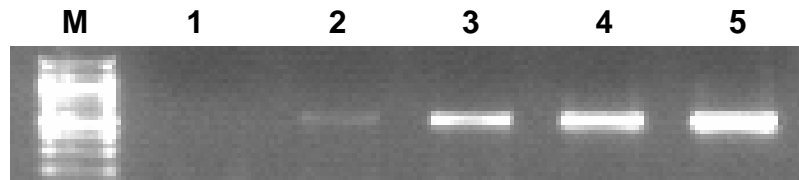
**B**



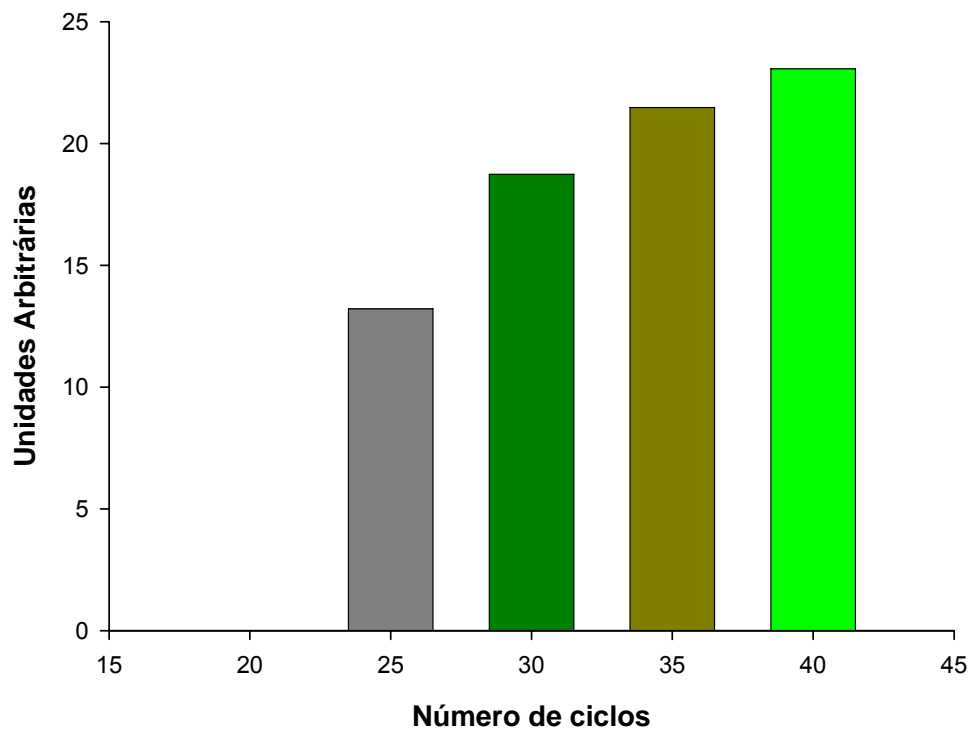
**Figura 4: Curva de ciclos para o gene *p53***

Padronização para a PCR, curva de ciclos para o gene *p53*. (A) Gel representativo da curva de ciclos para o gene *p53* determinado por RT-PCR para amostras de tecido mamário normal e fibroadenoma, onde **M** representa o marcador de pares de bases, **1**: 30 ciclos, **2**: 32 ciclos, **3**: 35 ciclos, **4**: 39 ciclos, **5**: 42 ciclos e **6**: 45 ciclos. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos para o gene *p53* determinado por RT-PCR para amostras de tecido mamário normal e fibroadenoma em unidades arbitrárias. A PCR para *p53* foi feita com 35 ciclos.

**A**



**B**



**Figura 5: Curva de ciclos para o gene *p21***

(A) Gel representativo da curva de ciclos para o gene *p21* determinado por RT-PCR para amostras de tecido mamário normal e fibroadenoma. **M** representa o marcador de pares de bases, **1**: 20 ciclos, **2**: 25 ciclos, **3**: 30 ciclos, **4**: 35 ciclos, **5**: 40 ciclos. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas da curva de ciclos para o gene *p21* determinado por RT-PCR para amostras de tecido mamário normal e fibroadenoma em UA. A PCR para *p21* foi feita com 30 ciclos.

#### 4. RESULTADOS

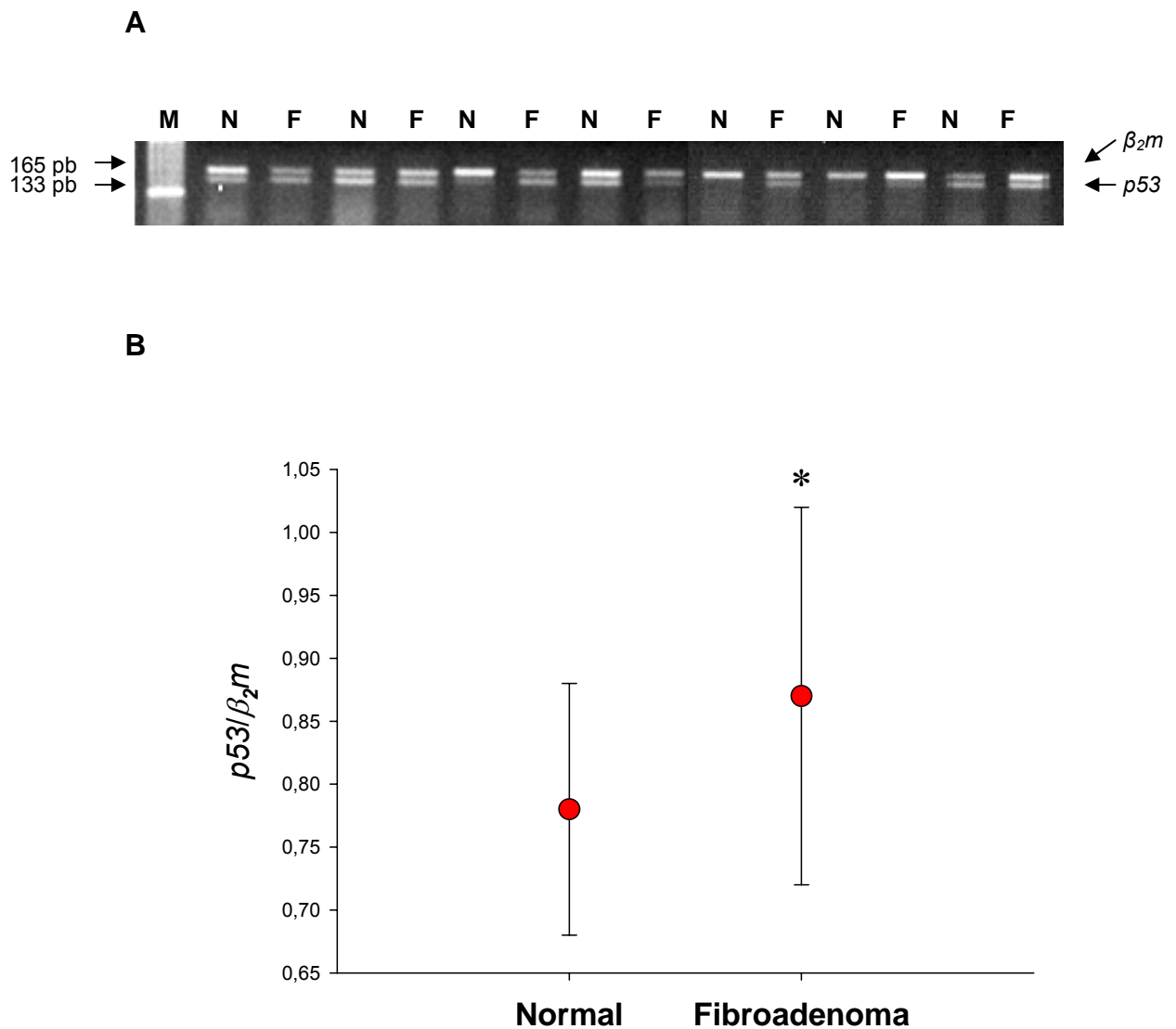
Foram incluídas neste estudo dezenove pacientes, das quais, cinco foram excluídas das análises devido à má qualidade do RNA total obtido, resultando em quatorze pacientes para as análises de *p53* e *p21*. A média de idade foi de 25 anos e a média da idade da menarca foi de 12 anos. Das quatorze pacientes, três já tiveram gravidez a termo. Onze pacientes apresentavam apenas um fibroadenoma, ao contrário de três pacientes que tiveram dois ou mais nódulos. No último caso, a amostra coletada e analisada foi somente do nódulo maior. A média do diâmetro dos fibroadenomas foi de 2,43 cm (tabela 3).

**Tabela 3:** Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes

	<b>Média ± DP</b>
N° de casos	14
Idade (anos)	25,14 ± 7,9
Idade da menarca (anos)	12,7 ± 1,77
IMC (kg/cm)	22,33 ± 4,65
Diâmetro do nódulo (cm)	2,43 ± 0,74

#### 4.1. Análise dos níveis de mRNA do gene *p53*

As amostras de fibroadenomas foram emparelhadas (entre os grupos para cada paciente) com tecido mamário normal adjacente. O mRNA foi avaliado por RT-PCR, conforme ilustrado na Figura 6. A imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com *primers* específicos para *p53* mostra uma maior expressão do gene *p53* nas amostras de fibroadenomas ( $0,87 \pm 0,15$ ) quando comparado com o tecido mamário normal adjacente ( $0,78 \pm 0,1$ ) com  $P=0,017$ . A análise semi-quantitativa desta imagem feita por densitometria foi representada graficamente como a média  $\pm$  desvio padrão dos níveis do *p53*, corrigidos pelos níveis da  $\beta_2m$ .

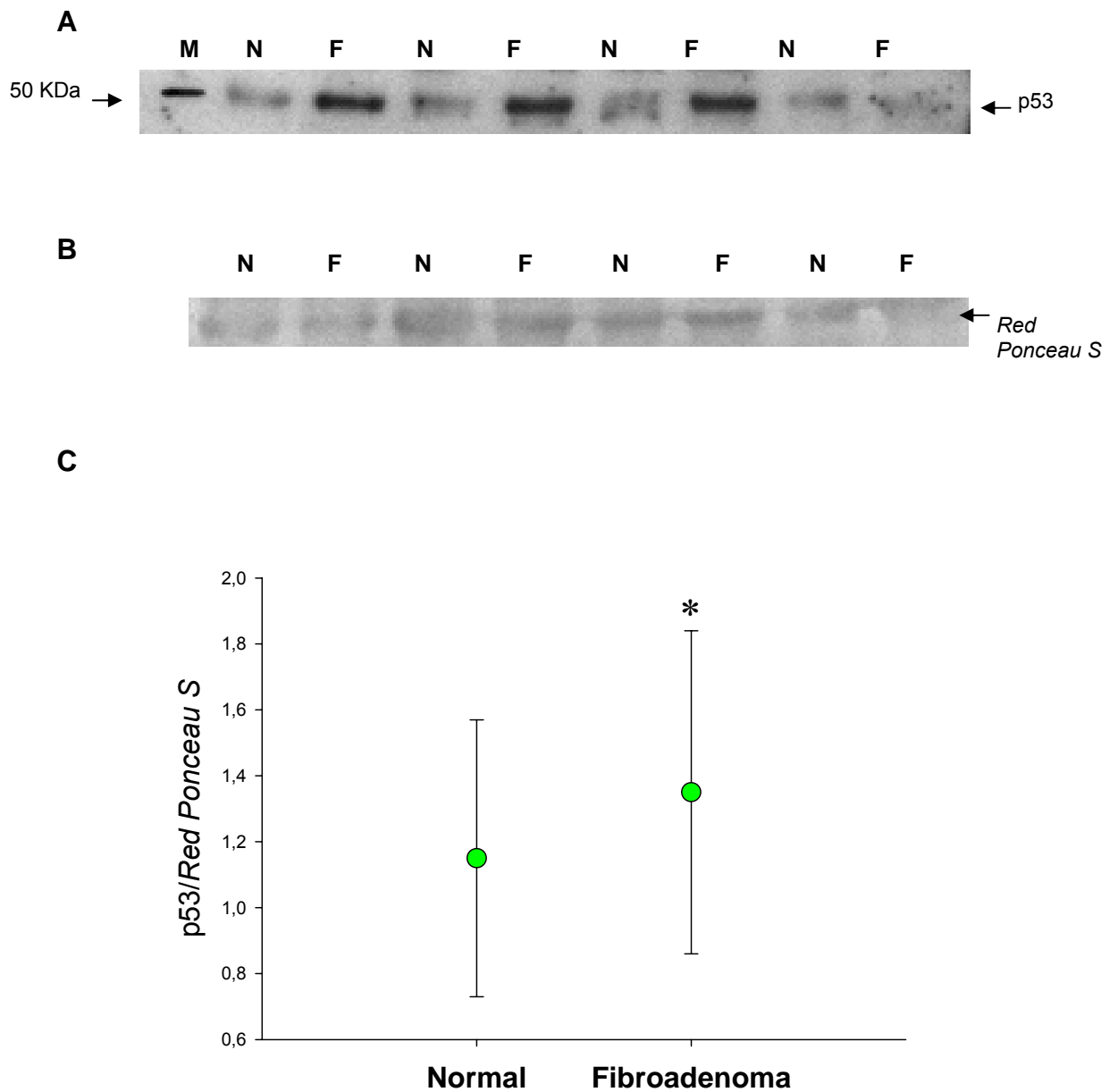


**FIGURA 6:** RT-PCR do mRNA do  $p53$  em fibroadenomas comparado com tecido mamário normal adjacente. (A) O fragmento de 133pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do  $p53$  e o de 165 pb ao da  $\beta_2m$ . **M:** marcador de peso molecular (pb), **N:** tecido mamário normal; **F:** fibroadenoma. (B) O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como relação  $p53/\beta_2m$  (média  $\pm$  DP) em unidades arbitrárias. Foi observado um aumento na expressão de  $p53$  (\* $P=0,017$ ) em fibroadenomas quando comparado ao tecido mamário normal.



#### 4.2. Análise dos níveis protéicos da proteína p53

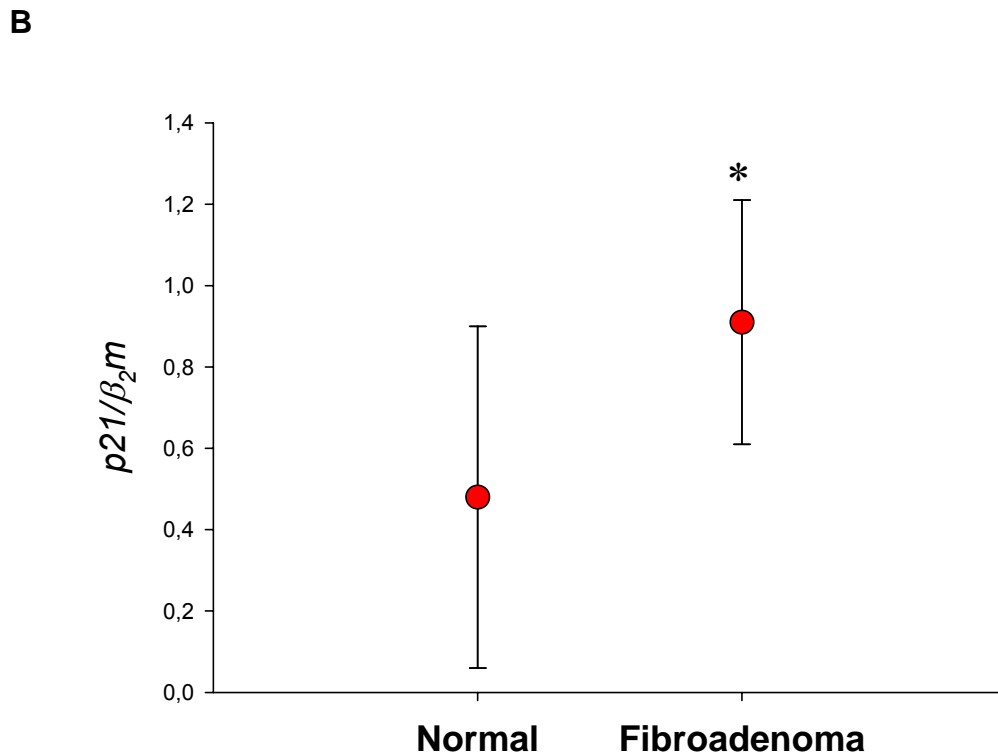
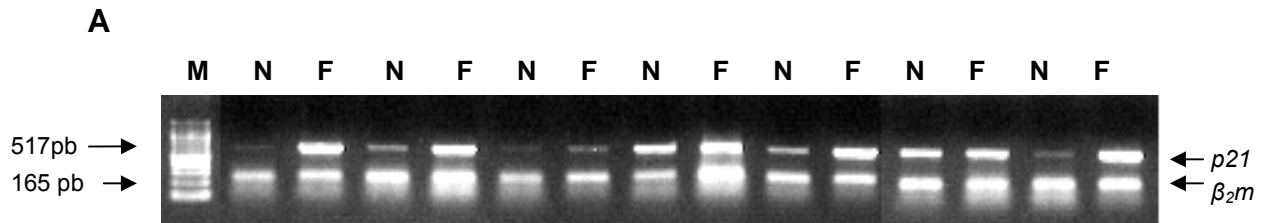
A Figura 7 ilustra os níveis protéicos da proteína p53 avaliados pela técnica de *western blot* com um anticorpo específico anti-p53. A imagem da auto-radiografia, após a incubação das membranas de NC com solução para quimio-luminescência mostra uma maior expressão da proteína p53 nas amostras de fibroadenomas ( $1,38 \pm 0,46$ ) quando comparado com o tecido mamário normal ( $1,15 \pm 0,39$ ) com  $P=0,001$ . Os dados foram obtidos através da análise densitométrica semi-quantitativa das bandas e representados graficamente como a média  $\pm$  desvio padrão dos níveis protéicos de p53 corrigidos por uma banda inespecífica obtida pela coloração da membrana com *Red Ponceau S*.



**FIGURA 7:** Análise dos níveis protéicos de p53 das amostras de fibroadenoma comparadas com tecido mamário normal adjacente. (A) As bandas que aparecem próximas ao marcador de 50 KDa representam a proteína de p53 com 53KDa. **M:** marcador de peso molecular, **N:** tecido mamário normal; **F:** fibroadenoma. (B) Normalização com uma banda inespecífica obtida pela coloração com *Red Ponceau S*. (C) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e expresso como a relação p53/*Red Ponceau S*. \* $P=0,001$  em relação ao tecido mamário normal.

### **4.3. Análise dos níveis de mRNA do gene *p21***

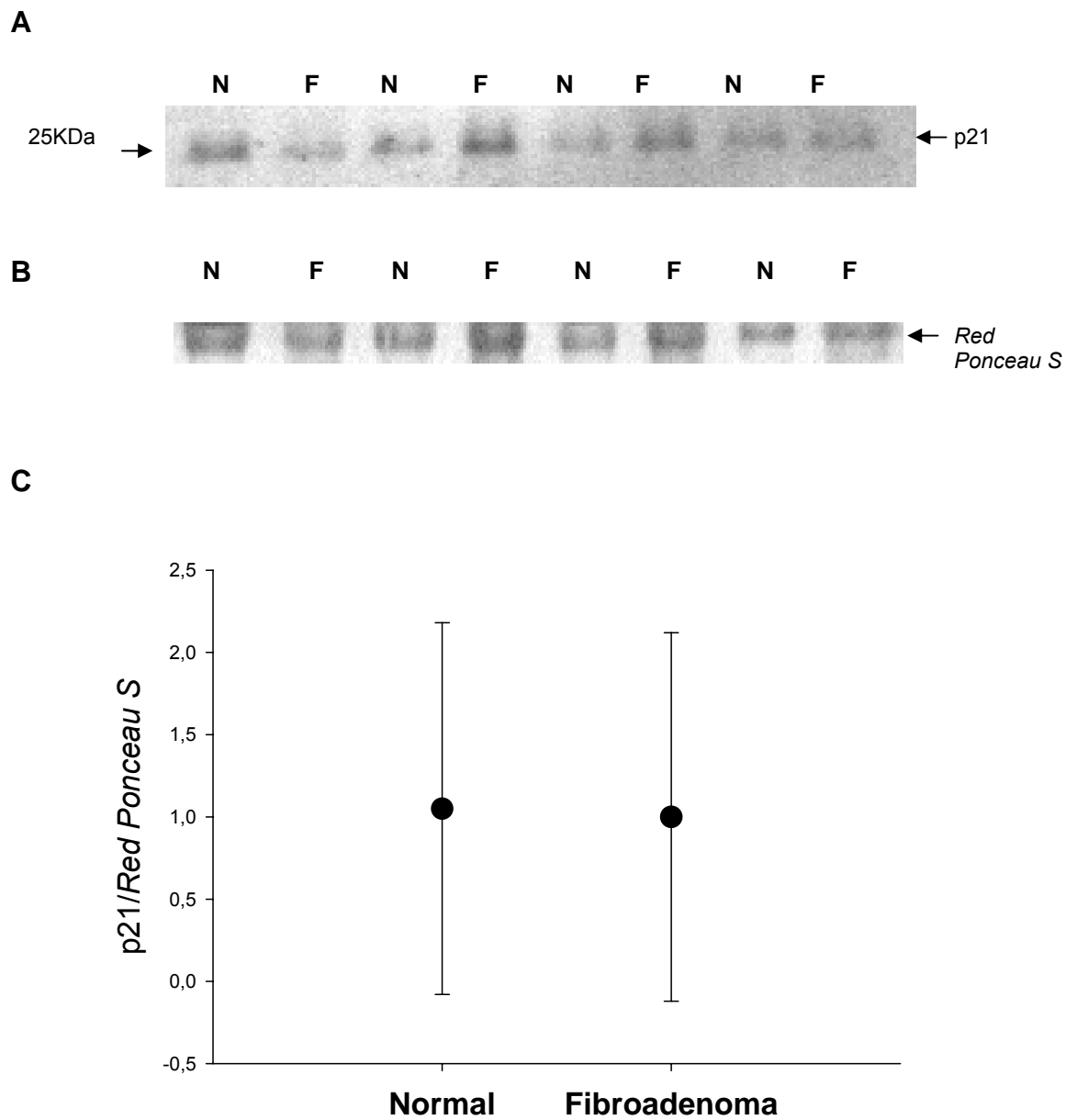
O mRNA do gene *p21* foi avaliado por RT-PCR, conforme ilustrado na Figura 8. A imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com *primers* específicos para *p21* mostra uma maior expressão do gene *p21* nas amostras de fibroadenomas ( $0,91 \pm 0,30$ ) quando comparado com o tecido mamário normal adjacente ( $0,48 \pm 0,42$ ) com  $P=0,003$ . A análise semi-quantitativa desta imagem feita por densitometria foi representada graficamente como a média  $\pm$  desvio padrão dos níveis do *p21*, corrigidos pelos níveis da  $\beta_2m$ .



**FIGURA 8:** RT-PCR do mRNA do *p21* em fibroadenomas comparado com tecido mamário normal adjacente. (A) Gel de agarose representativo. O fragmento de 517pb corresponde ao mRNA do *p21* e o de 165 pb ao da  $\beta_2m$ . **M:** marcador de peso molecular (pb), **N:** tecido mamário normal; **F:** fibroadenoma. (B) O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como relação  $p21/\beta_2m$  (média  $\pm$  DP) em unidades arbitrárias. Foi observada uma diferença significativa maior de *p21* (\* $P=0,003$ ) em fibroadenomas quando comparado com a mama normal.

#### 4.4. Análise dos níveis protéicos da proteína p21

Os níveis protéicos da proteína p21 foram avaliados pela técnica de *western blot* com um anticorpo específico anti-p21. A Figura 9 ilustra a imagem da autoradiografia, após a incubação das membranas de NC com solução para quimio-luminescência, onde os resultados da expressão protéica de p21 não apresentaram diferença significativa entre as amostras de fibroadenomas ( $0,97 \pm 0,16$ ) quando comparado com o tecido mamário normal ( $0,97 \pm 0,24$ ) com valor de  $P=0,97$ . Os dados foram obtidos através da análise densitométrica semi-quantitativa das bandas e representados graficamente como a média  $\pm$  desvio padrão dos níveis protéicos de p21 corrigidos por uma banda inespecífica obtida pela coloração da membrana com *Red Ponceau S*.



**FIGURA 9:** Análise dos níveis protéicos de p21 das amostras de fibroadenoma comparadas com tecido mamário normal adjacente. (A) As bandas que aparecem na altura do marcador de 25 KDa representam a proteína de p21 com 21KDa. **N:** tecido mamário normal; **F:** fibroadenoma. (B) Normalização com uma banda inespecífica obtida pela coloração com *Red Ponceau S*. (C) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e expresso como a relação p21/*Red Ponceau S*.

## 5. DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na formação de tumores benignos de mama, como os fibroadenomas, não são conhecidos. Os fibroadenomas, geralmente ocorrem em mamas de mulheres jovens. Em nosso estudo, a idade média das pacientes avaliadas com fibroadenoma foi de 25 anos. Este dado está de acordo com outros estudos que relataram que mais da metade das pacientes que apresentavam fibroadenomas tinham menos de 30 anos (Cant e cols, 1995; Carty e cols, 1995; Dixon e cols, 1996).

No presente estudo, observamos um aumento significativo na expressão gênica de *p53* e *p21* em fibroadenoma quando comparado com o tecido mamário normal adjacente. A proteína *p53* também foi significativamente mais expressa em fibroadenomas, diferente da proteína *p21*, que apresentou expressão similar nos tecidos estudados. Romanov e colaboradores demonstraram que células epiteliais de mama humana normal em cultura, continuam a proliferar na presença de *p53* e *p21* elevado, sugerindo que o escape do processo de senescência está associado a alterações genômicas que poderão levar à transformação neoplásica (Romanov e cols, 2001). Este mecanismo também poderia estar envolvido na formação de lesões benignas da mama. Kalogeraki e colaboradores compararam a expressão de *p53* em pacientes com doença de mama benigna e maligna, tendo demonstrado uma

superexpressão desta proteína também em doenças benignas. Esses autores sugeriram que a expressão diferencial de p53 pode identificar um subgrupo de doenças benignas de mama com um comportamento clínico potencialmente diferente (Kalogeraki e cols, 2000).

Nós avaliamos a forma normal (não mutada) de p53 tanto para a expressão gênica quanto a protéica. O gene supressor de tumor, *p53*, é ativado por diversos sinais de estresse por mecanismos que resultam na estabilização e acumulação da proteína p53 (Ashcroft e cols, 2000). A habilidade das células para induzir p53 em resposta a eventos potencialmente mutagênicos ou oncogênicos tem um papel crucial na prevenção da malignidade. A proteína supressora de tumor p53 atua para proteger as células da transformação maligna e o desenvolvimento da maioria dos tumores está associado à perda de função de p53 (Levine, 1997).

Diversos estudos têm reforçado a hipótese de que a expressão aumentada da proteína p53 normal pode prevenir o processo de transformação, enquanto que, a inativação de p53 predisporia a célula a tornar-se transformada (Eliyahu e cols, 1989; Finlay e cols, 1989; Levine, 1997).

Um estudo realizado em câncer de mama e tecido benigno mostrou que a proteína p53 também foi detectada nos tecidos benignos ao contrário da proteína p21. Em quase todos os cânceres p53 e p21 foram detectadas, mas não foi encontrada uma correlação entre elas. A proteína p21 foi normalmente distribuída nos grupos com baixos níveis de p53 e não foi detectada em grupos com níveis aumentados de p53 (Westhof e cols, 2006).



Mutações no gene *p53* ocorrem em aproximadamente 50% de todos os tipos de câncer (Hollstein e cols, 1991; Levine, 1997), mas Franco e colaboradores analisaram amostras de fibroadenoma e nenhuma mutação foi encontrada no gene *p53* (Franco e cols, 2001). Alterações genéticas envolvidas em tumores malignos de mama não estão presentes em fibroadenomas (Franco e cols, 2003).

Através da função de *p53*, como ativadora ou repressora da transcrição, vários genes que controlam o ciclo celular, morte celular e outras funções celulares são seus alvos seqüenciais, entre eles o *p21*.

O inibidor de cinase dependente de ciclina *p21<sup>waf1/cip1</sup>* tem um papel chave no controle do ciclo celular e é principalmente regulado no nível transcricional. Enquanto a indução do *p21* predominantemente leva à interrupção do ciclo celular, sua repressão pode levar a respostas variadas dependendo do contexto (Gartel & Radhakrishnan, 2005).

O inibidor de Cdk *p21* é freqüentemente responsável pela indução da interrupção do ciclo celular de forma dependente ou independente de *p53*. A interrupção do ciclo celular permite que as células reparem seus danos e então continuem a divisão celular. Por um lado, a função de *p21* como inibidora da proliferação celular pode contribuir para a habilidade do *p21* atuar como gene supressor de tumor. Por outro lado, a capacidade de *p21* para induzir a parada do ciclo celular após estresse pode proteger as células da apoptose induzida pelo estresse. A atividade antiapoptótica do *p21* pode contribuir para que ele atue como oncogene. Isto confere ao *p21* duas ações antagônicas em que ele freqüentemente inibe a apoptose (pró-cancer) ao contrário de seus efeitos antiproliferativos

(anticâncer) (Gartel & Tyner, 2002). Estas ações antagônicas do p21 talvez possam explicar os resultados obtidos no presente trabalho, em que o aumento do mRNA do *p21* não refletiu no aumento de expressão da proteína p21. Provavelmente, o aumento transcricional do *p21*, induzido por p53, foi uma resposta antiproliferativa clássica deste regulador do ciclo celular, como gene alvo seqüencial da ação de p53. Além disso, outros fatores pós-transcricionais, ainda desconhecidos, podem ter atuado para impedir a ação antiapoptótica da proteína p21, o que poderia levar a transformação dessas células, que ainda mantém a sua diferenciação, a um estágio de carcinoma. Esta idéia é reforçada por um estudo publicado recentemente, no qual foram analisadas a expressão das proteínas p53, p21 e p16 em adenocarcinoma endometrial e controles, onde aos maiores índices de proliferação e de expressão de p53 e p21 ocorreram nos tumores malignos mais indiferenciados ou estágios mais avançados (Buchynska & Nesina, 2006).

Estudos com adenocarcinomas de cólon demonstraram uma baixa expressão de p21 associada com maior expressão de p53 (Doglioni e cols, 1996). Estes pesquisadores também reforçam o conceito de que p21 está diretamente relacionada com a diferenciação terminal deste tecido. Por outro lado, Pinto e colaboradores não encontraram uma correlação entre p53 e p21 com características proliferativas em carcinomas mamários (Pinto e cols, 2005).

A análise quantitativa por imunistoquímica da relação p21/p53 em carcinoma de mama invasivo demonstrou que o grupo que apresentou prevalência da proteína p21 foi significativamente associado com a presença de metástases, maior índice de recorrência e menor intervalo de tempo livre da doença, caracterizando um grupo de

pacientes com pior prognóstico. O grupo de pacientes com prevalência de p53 apresentou tumores grandes, com grande potencial de proliferação, sugerindo a presença de p53 mutada, enquanto o grupo que apresentou uma baixa expressão de ambas as proteínas, portanto, uma relação equilibrada, correspondeu a tumores bem diferenciados com um bom prognóstico (Ceccarelli e cols, 2001). Estes dados reforçam a idéia da ação oncogênica da proteína p21.

Considerando a idéia de que o acúmulo da proteína p53 normal pode restringir a transformação e que a proteína p21 aumentada poderia induzir a formação de tumor, os dados obtidos no presente trabalho talvez possam explicar, em parte, a manutenção do fenótipo diferenciado e o crescimento autolimitado dos fibroadenomas. Desta forma, nossos dados contribuem para o conhecimento dos mecanismos de controle do ciclo celular em células de mama, de regulação da proliferação e como ela é desregulada em doenças benignas da mama como o fibroadenoma.

Doenças benignas da mama estão sob um complexo sistema de controle por fatores hormonais sistêmicos e locais. O melhor conhecimento do comportamento biológico e dependência hormonal dessas doenças podem caracterizar subgrupos de pacientes com um comportamento clínico potencialmente diferente e diminuir o número de procedimentos invasivos como biópsias e cirurgias.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram uma maior expressão gênica e protéica de p53 em fibroadenomas quando comparados com a mama normal, indicando uma possível participação deste gene no desenvolvimento dos fibroadenomas.

A expressão gênica de *p21* também foi maior em fibroadenomas, embora a expressão protéica não tenha apresentado diferença significativa. Estes resultados sugerem que fatores pós-transcricionais podem estar envolvidos na regulação do *p21* e que este gene também pode estar envolvido na formação de fibroadenomas.

## 7. REFERÊNCIAS

- Akashi, M; Osawa, Y; Koeffler, HP and Hachiya, M.1999. p21WAF1 expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. *Biochem J* 337 ( Pt 3): 607-16.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K and Walter, P.2004. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre, Artmed.
- Ashcroft, M; Taya, Y and Vousden, KH.2000. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20(9): 3224-33.
- Borresen-Dale, AL.2003. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 21(3): 292-300.
- Bradford, MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brum, IS; Morsch, DM; Pozzobon, A; Boeri, VA; Geib, G and Spritzer, PM.2003. Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation. *Horm Res* 60(5): 209-14.
- Buchynska, LG and Nesina, IP.2006. Expression of the cell cycle regulators p53, p21(WAF1/CIP1) and p16(INK4a) in human endometrial adenocarcinoma. *Exp Oncol* 28(2): 152-5.
- Bukholm, IK and Nesland, JM.2000. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 436(3): 224-8.

- Cant, PJ; Madden, MV; Coleman, MG and Dent, DM.1995. Non-operative management of breast masses diagnosed as fibroadenoma. *Br J Surg* 82(6): 792-4.
- Carty, NJ; Carter, C; Rubin, C; Ravichandran, D; Royle, GT and Taylor, I.1995. Management of fibroadenoma of the breast. *Ann R Coll Surg Engl* 77(2): 127-30.
- Ceccarelli, C; Santini, D; Chieco, P; Lanciotti, C; Taffurelli, M; Paladini, G and Marrano, D.2001. Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 95(2): 128-34.
- Cericatto, R; Pozzobon, A; Morsch, DM; Menke, CH; Brum, IS and Spritzer, PM.2005. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids* 70(3): 153-60.
- Chomczynski, P and Sacchi, N.1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Clemons, M and Goss, P.2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344(4): 276-85.
- Cohen, SM and Ellwein, LB.1990. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249(4972): 1007-11.
- Cotran, RS; Kumar, V and Robbins, SL.1989. Female Breast. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Cotran, RS; Kumar, V and Robbins, SL. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 1183-1204.
- Courtillot, C; Plu-Bureau, G; Binart, N; Balleyguier, C; Sigal-Zafrani, B; Goffin, V; Kuttann, F; Kelly, PA and Touraine, P.2005. Benign breast diseases. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10(4): 325-35.
- Dixon, JM; Dobie, V; Lamb, J; Walsh, JS and Chetty, U.1996. Assessment of the acceptability of conservative management of fibroadenoma of the breast. *Br J Surg* 83(2): 264-5.

- Dogliani, C; Pelosio, P; Laurino, L; Macri, E; Meggiolaro, E; Favretti, F and Barbareschi, M.1996. p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol* 179(3): 248-53.
- Draetta, G.1990. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci* 15(10): 378-83.
- el-Deiry, WS; Harper, JW; O'Connor, PM; Velculescu, VE; Canman, CE; Jackman, J; Pietenpol, JA; Burrell, M; Hill, DE; Wang, Y and et al.1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54(5): 1169-74.
- el-Deiry, WS; Tokino, T; Velculescu, VE; Levy, DB; Parsons, R; Trent, JM; Lin, D; Mercer, WE; Kinzler, KW and Vogelstein, B.1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-25.
- El-Wakeel, H and Umpleby, HC.2003. Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer. *Breast* 12(5): 302-7.
- Eliyahu, D; Michalovitz, D; Eliyahu, S; Pinhasi-Kimhi, O and Oren, M.1989. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22): 8763-7.
- Finlay, CA.1993. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* 13(1): 301-6.
- Finlay, CA; Hinds, PW and Levine, AJ.1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57(7): 1083-93.
- Franco, N; Arnould, L; Mege, F; Picard, SF; Arveux, P and Lizard-Nacol, S.2003. Comparative analysis of molecular alterations in fibroadenomas associated or not with breast cancer. *Arch Surg* 138(3): 291-5.
- Franco, N; Picard, SF; Mege, F; Arnould, L and Lizard-Nacol, S.2001. Absence of genetic abnormalities in fibroadenomas of the breast determined at p53 gene mutations and microsatellite alterations. *Cancer Res* 61(21): 7955-8.
- Gadow, EC.2004. Fisiologia da Glândula Mamária. *Fisiologia Humana de Houssay*. Cingolani, HE and Houssay, AB. Porto Alegre, Artmed: 722-725.

- Gartel, AL and Radhakrishnan, SK.2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65(10): 3980-5.
- Gartel, AL and Tyner, AL.2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1(8): 639-49.
- Goehring, C and Morabia, A.1997. Epidemiology of benign breast disease, with special attention to histologic types. *Epidemiol Rev* 19(2): 310-27.
- Gompel, A; Levy, D; Chaouat, M; Forgez, P and Rostene, W.2001. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. *Maturitas* 38(1): 39-44.
- Graham, JD and Clarke, CL.1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4): 502-19.
- Haendler, B; Hofer-Warbinek, R and Hofer, E.1987. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *Embo J* 6(4): 947-50.
- Harris, CC and Hollstein, M.1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329(18): 1318-27.
- Hasebe, T; Imoto, S; Sasaki, S; Tsubono, Y and Mukai, K.1999. Proliferative activity and tumor angiogenesis is closely correlated to stromal cellularity of fibroadenoma: proposal fibroadenoma, cellular variant. *Pathol Int* 49(5): 435-43.
- Hofseth, LJ; Hussain, SP and Harris, CC.2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25(4): 177-81.
- Hollstein, M; Sidransky, D; Vogelstein, B and Harris, CC.1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015): 49-53.
- Kalogeraki, A; Panayiotides, J; Tamiolakis, D; Tzardi, M; Chaniotis, V; Chalkiadakis, G; Melissas, J; Stifsis, D; Kanavaros, P and Delides, GS.2000. P53 expression in patients with malignant and benign breast diseases. *Anticancer Res* 20(3A): 1801-5.
- Kemp, CJ; Donehower, LA; Bradley, A and Balmain, A.1993. Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* 74(5): 813-22.



- La Rosa, S; Sessa, F; Colombo, L; Tibiletti, MG; Furlan, D and Capella, C.2001. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 54(1): 37-41.
- Laemmli, UK.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lain, S; Midgley, C; Sparks, A; Lane, EB and Lane, DP.1999. An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp Cell Res* 248(2): 457-72.
- Lane, DP and Crawford, LV.1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701): 261-3.
- Lee, MH; Reynisdottir, I and Massague, J.1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9(6): 639-49.
- Levine, AJ.1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-31.
- Lewin, B.2000. Genes VII. Porto Alegre, Artmed.
- Li, FP; Fraumeni, JF, Jr.; Mulvihill, JJ; Blattner, WA; Dreyfus, MG; Tucker, MA and Miller, RW.1988. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48(18): 5358-62.
- Li, YJ; Laurent-Puig, P; Salmon, RJ; Thomas, G and Hamelin, R.1995. Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene* 10(3): 599-601.
- Ling, MT; Chan, KW and Choo, CK.2001. Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line. *J Endocrinol* 170(1): 287-96.
- Lu, S; Liu, M; Epner, DE; Tsai, SY and Tsai, MJ.1999. Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* 13(3): 376-84.
- Lydon, JP; Sivaraman, L and Conneely, OM.2000. A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(3): 325-38.

- Macleod, KF; Sherry, N; Hannon, G; Beach, D; Tokino, T; Kinzler, K; Vogelstein, B and Jacks, T.1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9(8): 935-44.
- MacMahon, B; Cole, P; Lin, TM; Lowe, CR; Mirra, AP; Ravnihar, B; Salber, EJ; Valaoras, VG and Yuasa, S.1970. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 43(2): 209-21.
- Milner, J.1997. Structures and functions of the tumor suppressor p53. *Pathol Biol (Paris)* 45(10): 797-803.
- Mousses, S; Ozcelik, H; Lee, PD; Malkin, D; Bull, SB and Andrulis, IL.1995. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet* 4(6): 1089-92.
- Noguchi, S; Motomura, K; Inaji, H; Imaoka, S and Koyama, H.1993. Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. *Cancer Res* 53(17): 4071-4.
- Orcy, RB; Brum, I; da Silva, RS; Kucharski, LC; Corleta, HE and Capp, E.2005. Insulin receptor tyrosine kinase activity and substrate 1 (IRS-1) expression in human myometrium and leiomyoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123(1): 107-10.
- Osborne, MP.1999. Breast Anatomy and Development. *Diseases of the Breast*. Harris, JR; Lippman, ME; Morrow, M and Osborne, CK. Philadelphia, Lippincott William & Wilkins: 1-13.
- Osin, PP and Lakhani, SR.1999. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res* 1(1): 36-40.
- Ostrakhovitch, EA and Cherian, MG.2004. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys* 423(2): 351-61.
- Parker, SL; Tong, T; Bolden, S and Wingo, PA.1996. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 46(1): 5-27.

- Pinto, AE; Andre, S; Laranjeira, C and Soares, J.2005. Correlations of cell cycle regulators (p53, p21, pRb and mdm2) and c-erbB-2 with biological markers of proliferation and overall survival in breast cancer. *Pathology* 37(1): 45-50.
- Reich, NC; Oren, M and Levine, AJ.1983. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 3(12): 2143-50.
- Reihnsaus, E; Kohler, M; Kraiss, S; Oren, M and Montenarh, M.1990. Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells. *Oncogene* 5(1): 137-45.
- Robson, CN; Gnanapragasam, V; Byrne, RL; Collins, AT and Neal, DE.1999. Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *J Endocrinol* 160(2): 257-66.
- Romanov, SR; Kozakiewicz, BK; Holst, CR; Stampfer, MR; Haupt, LM and Tlsty, TD.2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409(6820): 633-7.
- Russo, IH and Russo, J.1996. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104(9): 938-67.
- Russo, J and Russo, IH.1987. The mamary gland. New York, Plenum Publishing Corporation.
- Sheikh, MS; Li, XS; Chen, JC; Shao, ZM; Ordonez, JV and Fontana, JA.1994. Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* 9(12): 3407-15.
- Sherr, CJ.1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73(6): 1059-65.
- Sherr, CJ and Roberts, JM.1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9(10): 1149-63.
- Shiohara, M; el-Deiry, WS; Wada, M; Nakamaki, T; Takeuchi, S; Yang, R; Chen, DL; Vogelstein, B and Koeffler, HP.1994. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 84(11): 3781-4.
- Somasundaram, K; Zhang, H; Zeng, YX; Houvras, Y; Peng, Y; Zhang, H; Wu, GS; Licht, JD; Weber, BL and El-Deiry, WS.1997. Arrest of the cell cycle by the

- tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 389(6647): 187-90.
- Steinman, RA; Hoffman, B; Iro, A; Guillouf, C; Liebermann, DA and el-Houseini, ME.1994. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9(11): 3389-96.
- Stewart, ZA and Pietsenpol, JA.2001. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol* 14(3): 243-63.
- Sundfors, CH and Collan, YU.1997. Target length and primer concentration affect the gain of c-erbB2 and p53 amplicons. *Faseb J* 11(11): 897-903.
- Tao, W and Levine, AJ.1999. Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3077-80.
- Tobias, P; De Luca, LA; Schmitt, FCL; Frederique Jr, U and Uemura, G.1999. Revisão histopatológica e análise dos fibroadenomas. *Revista Brasileira de Mastologia* 9: 68-74.
- Westhof, G; Olbrecht, M; Wolff, M; Schiermeier, S; Zimmermann, RC and Hatzmann, W.2006. Testing of functional integrity of p53 protein in primary breast cancer by a rapid quantitative p53-p21 double assay may improve the clinical value of p53. *Tumour Biol* 27(5): 252-60.
- Xavier, NL; Silveira, LGG; Schmidt, SN; Hannai, ND; Gheller, JP and Xavier, M.1996. Fibroadenoma de mama - aspectos clínicos e epidemiológicos. *Jornal Brasileiro de Ginecologia* 106(7): 249-253.

## ANEXO 1

Protocolo de estudo de técnicas de RT-PCR na avaliação de Fibroadenomas e do Tecido Mamário Normal:

Caso Nº:

Registro HCPA:

Iniciais do Nome:

Data do Procedimento Cirúrgico:

Tipo de Cirurgia: Mama: ( ) D ( ) E

Nº de nódulos:

Idade:

Peso:

Altura:

Idade da Menarca (primeira menstruação):

Paridade: G \_\_ P \_\_ C \_\_ Ab \_\_

Primeira gestação no termo aos \_\_\_ anos

Data de término da última gestação: \_\_/\_\_/\_\_

Período de amamentação na última gestação: \_\_\_ dias

Método Anticoncepcional atual:

Datas de início dos 3 últimos ciclos menstruais e duração do fluxo:

1- \_\_/\_\_/200\_, fluxo de \_\_ dias;

2- \_\_/\_\_/200\_, fluxo de \_\_ dias;

3- \_\_/\_\_/200\_, fluxo de \_\_ dias.

Fase do ciclo em que foi realizada a cirurgia:

1- ( ) Fase folicular inicial;

2- ( ) Fase folicular tardia;

3- ( ) Fase lútea inicial;

4- ( ) Fase lútea tardia;

5- ( ) Uso de método anticonceptivo hormonal.

## ANEXO 2

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título:** Expressão gênica e protéica de p53 e de p21 em fibroadenoma e no tecido mamário normal adjacente

Prezada Sra.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de nódulos mamários benignos. Dentre as lesões mamárias benignas que podem ser estudadas destacam-se os fibroadenomas, que são nódulos bastante freqüentes nas clínicas de mastologia. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da mama e levar a formação de tumores como o fibroadenoma. Como a Sra. tem o diagnóstico de fibroadenoma e foi recomendada cirurgia para retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em informar dados sobre sua história ginecológica e obstétrica e a permitir que um pequeno fragmento do seu nódulo mamário (10 mm x 5 mm) e do tecido mamário normal (10 mm x 5 mm) que o envolve, sejam encaminhados para estudo genético. O restante do nódulo da mama será destinado ao exame histopatológico normal.

Se a Sra. concordar, armazenaremos as amostras por até cinco anos, para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de mama. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora.

A Sra. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados

referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33163671 ou 99969044), o Dr. Rodrigo Cericatto (51 99632234) e Lolita Schneider (51 84480484). Caso a Sra. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contactar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada e, das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: \_\_\_\_\_

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_