



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

EDUARDO AUGUSTO VASCONCELOS DE FREITAS RAMALHO

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NOS GENES p53, BRCA1 E BRCA2 EM
CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA (CDI)

Recife
2012

EDUARDO AUGUSTO VASCONCELOS DE FREITAS RAMALHO

**Avaliação alterações nos genes p53, BRCA1 e BRCA2 em Carcinoma
Ductal Invasivo de Mama (CDI)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM).

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

R165a Ramalho, Eduardo Augusto Vasconcelos de Freitas

Avaliação de alterações nos genes p53, BRCA1 em Carcinoma Ductal Invasivo de Mama (CDI) / Eduardo Augusto Vasconcelos de Freitas Ramalho. – Recife: O Autor, 2012.

46 folhas: fig.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2012.

Inclui referências

1. Mamas – Câncer 2. Câncer em mulheres 3. Câncer – Aspectos genéticos I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de Oliveira (coorientadora) III. Título.

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

REITOR

Prof(a). Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof(a). Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO DE
IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RAMALHO, Eduardo Augusto Vasconcelos de Freitas.

Título: Avaliação de Alterações nos genes p53, BRCA1 e BRCA2 em Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) de mama.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

*“Grandes espíritos sempre encontraram
oposições violentas de mentes
mediócras.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter me sustentado ao longo da minha jornada (“Até aqui nos ajudou o Senhor.” 1Sm 7:12).

A minha Mãe pelo suporte diário e encorajamento nas horas difíceis.

Ao meu Pai pelas preciosas orientações e pelo exemplo na área acadêmica.

A Margarida Lemos (Magal) pela imensa ajuda, paciência, atenção e presteza.

Ao meu orientador, o Prof. Eduardo Beltrão pela confiança, suporte, ensinamentos e amizade.

A Prof^a. Betânia Melo pela confiança, ajuda e ensinamentos.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior por ter acreditado em mim e por não medir esforços para nos oferecer melhores condições de trabalho a cada dia.

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho pelos esforços visando sempre à melhoria da qualidade dos trabalhos realizados no LIKA.

Aos meus colegas do grupo Biomarcadores no Câncer (BmC): Moacyr Barreto, Renato Wanderley, Juliana Vasconcelos, Juliana Brandão, Steffany, Sinara Mônica, Luiza Rayana, Lúcia, Gabriela Souto, Petra Barros, Matheus Filgueira, Paula, Renato Ferreira, Bruno Trajano, João Quirino, Edso Henrique, Antônio Felix, Gilberto Tenório, Arthur Clark, Marina Ferraz, Ana Rosa, Diego Albuquerque pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas que fazem o LIKA e PPGBAS: Marek Ekert, José Eriton (Pai Príon), Julliana Nunes, Marcela Outtes, Sérgio Lima, Mayara Mansur, Laís Westein, Rafael Padilha, Mariana Cabrera, Paula Vir, Keilla, Rafaella

Nascimento, Roberta Godone, Roberta Ventura, André Galvão, Ronald, Anselmo, Roeckson. Agradecimento especial a Marina Cartaxo e Carmelita Lima (Carmel) pela atenção, disponibilidade e prontidão em servir.

A Eliete Rodrigues, Paulina, Ilma, Conceição Seu Otaviano, Vera, Edson e Paulo pelos serviços prestados.

As minhas amigas Livia Sena, Rosana Ximenes e Adriana Moneta pelo encorajamento e suporte.

A todos os meus amigos queridos que congregam na Igreja Episcopal Carismática do Brasil pelas orações e encorajamento.

A CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Sabe-se que os genes p53, BRCA1 e BRCA2 apresentam a característica em comum de serem considerados supressores tumorais. Eventos genéticos e epigenéticos são frequentes ao longo de todo o genoma humano. Mutações somáticas são passíveis de ocorrer nas regiões codificantes de genes específicos, alterando sua sequência e gerando proteínas mutantes, as quais resultam numa alteração de sua capacidade funcional ou até mesmo a perda dela. Este trabalho objetivou avaliar alterações epigenéticas nas regiões promotoras dos genes BRCA1 e BRCA2 através da técnica de PCR para Metilação Específica (MSP) e correlacionar mutações pontuais nos exons 4 e 7 do gene p53 como fator de risco para o carcinoma ductal invasivo (CDI) de mama na população feminina do Recife atendida no Hospital das Clínicas (HC-UFPE). Cinquenta biópsias de mama diagnosticadas com CDI fixadas em formalina e embebidas em parafina foram obtidas do Setor de Anatomia Patológica do HC-PE e cinco amostras de tecido mamário de mulheres submetidas à mastectomia estética foram usadas como controle normal. O DNA das amostras foram extraídos e, então, amplificados por MSP. Para avaliação do perfil mutacional utilizou-se a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com as enzimas *Bst*UI e *Hae*III para verificação dos polimorfismos nos exons 4 e 7, respectivamente. A frequência no padrão de metilação para o gene BRCA2 foi de 46,9% enquanto a frequência de mutações pontuais nos códons 72 (exon 4) e 249 (exon 7) do gene p53 foram de 91,8% e 8,1%, respectivamente. Para o BRCA1 os resultados obtidos foram inconsistentes quanto ao seu padrão de metilação. Os resultados mostraram que o polimorfismo do códon 72 apresentou-se estatisticamente significativo para metástase podendo ser utilizado como um potencial biomarcador auxiliar no diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama humana. Palavras-chave: p53, BRCA1, BRCA2, câncer, metilação, epigenética.

ABSTRACT

p53, BRCA1 and BRCA2 genes are tumor suppressors. Genetic and epigenetic events are frequent in the human genome. Somatic mutations are likely to occur in coding regions of specific genes by changing their sequence and generating mutant proteins, which can result in changes in their function or even their loss. This study aimed to evaluate epigenetic changes in promoter regions of BRCA1 and BRCA2 genes using Methylation Specific PCR (MSP) technique and correlate mutations in exons 4 and 7 of p53 gene as a risk factor for invasive ductal carcinoma (IDC) of breast and their potential for metastasis in women diagnosed at Hospital das Clínicas (HC-UFPE) in Recife. Fifty breast formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies diagnosed with IDC were obtained from the Pathology Sector of HC-UFPE and six breast tissue samples from women submitted to esthetic mastectomy were used as normal control. Samples were subjected to DNA extraction and, then, amplified by MSP. PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) was used to evaluate the mutational profile in exons 4 and 7 polymorphisms with the enzymes *Bst*UI and *Hae*III, respectively. The frequency of methylation pattern in BRCA2 gene was 46.9%. Genotyping of p53 codon 72 (exon 4) polymorphism and codon 249 (exon 7) mutation and their possible role in breast cancer risk showed that the frequency was 91.8% and 8.1%, respectively. BRCA1 gene analysis were not significant. Results showed that codon 72 polymorphism is statistically significant for metastasis being indicated as potential auxiliary biomarker of invasive ductal carcinoma.

Keywords: BRCA1, epigenetics, MSP, p53, exon 4, polymorphism, breast cancer, codon 249.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1: Estrutura mamária: Células ductais compõem as Unidades Terminais Ducto Lobulares (TDLU) (DIMRI, BAND e BAND, 2005).....16

Figura 2: Esquema de progressão tumoral em Câncer de Mama. (BREAST, 2007).....16

Figura 3: Representação esquemática das Ilhas CpG em genes supressores tumorais (ESTELLER, 2002).....19

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: Methylation status of *BRCA2* gene.....38

Figure 2a: PCR-RFLP Analysis of the *p53* gene exon 4.....39

Figure 2b: PCR-RFLP Analysis of the *p53* gene exon 7.....39

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AJCC	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
BRCA1	do inglês, <i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	do inglês, <i>Breast Cancer 2</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxiribonucleic Acid</i>
DNMT	DNA Metiltransferases, do inglês <i>DNA Methyltransferases</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kDa	Kilodaltons
mRNA	do inglês <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSP	do inglês <i>Methylation Specific PCR</i>
NBR2	do inglês <i>Neighborhood gene 2</i>
NHEJ	do inglês, <i>non-homologous end joining</i>
P53	Proteína 53
pb	Pares de bases
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RPM	Rotações por minuto
SNP	do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TP53	do inglês <i>Tumor Protein 53</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Câncer	13
2.2 Epigenética e o Câncer	17
2.3 BRCA1 e BRCA2	20
2.4 P53	21
2.5 BRCA1/BRCA2/P53	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5 ARTIGO CIENTÍFICO	31
6 CONCLUSÕES	47

1 INTRODUÇÃO

O mapeamento preciso dos padrões de metilação do DNA em ilhas CpG tornou-se essencial para a compreensão de diversos processos biológicos, tais como a regulação gênica, inativação do cromossomo X e silenciamento de genes supressores tumorais. A técnica de MSP (PCR para metilação-específica) pode rapidamente avaliar o padrão de metilação de praticamente qualquer região promotora a qual esteja contido nela uma ou mais Ilhas CpG. O uso dessa técnica implica na modificação prévia do DNA por bissulfito de sódio, convertendo, através de uma reação de deaminação, todas as citosinas em timina. Subsequentemente, esse DNA é submetido a uma reação de PCR com iniciadores específicos para amplificação do alelo metilado e não-metilado. A MSP requer apenas pequenas quantidades de DNA, é sensível a 0,1% alelos metilados de uma dada Ilha CpG e pode ser realizada em amostras extraídas a partir de tecido parafinado. A detecção precoce da metilação aberrante em genes relacionados à carcinogênese pode ser essencial para diagnóstico, prognóstico e/ou detecção do potencial metastático. Neste estudo foi utilizada a MSP para avaliar o padrão de metilação nas regiões promotoras dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2. Os achados epigenéticos foram correlacionados com mutações pontuais no também supressor de tumor p53, através de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e com os dados clínico-histopatológicos das pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas (INCA, 2011).

O câncer de mama constitui umas das principais neoplasias afetando 1.3 milhão de mulheres no mundo inteiro a cada ano (GANJEWALA, 2009; PUGALENDHI *et al*, 2010). Os diversos tipos de câncer constituem um problema da área de saúde pública, uma vez que apresentam, em geral, uma incidência crescente e alta taxa de mortalidade. Apesar dos esforços que têm sido feitos, especialmente nas últimas décadas, visando o controle deste conjunto de doenças, este ainda representa uma importante causa de morte no mundo. Dados futuros estimam que no ano de 2030 haverá 21 milhões de casos de câncer envolvendo ambos os sexos (INCA, 2011).

No Brasil o câncer de mama constitui uma importante causa de morte, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. A partir dos 35 anos, sua incidência cresce rápida e progressivamente, sendo a segunda causa de morte no sexo feminino. Dados mostram que a incidência da doença vem aumentando com o passar dos anos, onde as estimativas para o ano de 2012 são de 52.680 novos casos (INCA 2012).

Sendo uma doença multifatorial, o câncer de mama apresenta uma grande variabilidade fenotípica, sua gênese é complexa e pode ser influenciada tanto por fatores endógenos tais como alterações hormonais e predisposição genética, quanto por fatores exógenos como dieta hipercalórica, fumo, nuliparidade e menarca precoce. (INCA, 2012).

Sendo a estrutura mamária feminina (Figura 1) complexa, o câncer de mama pode ser classificado quanto à localização neste órgão. Assim temos (Breast, 2007):

Sarcomas: sua origem é no tecido conjuntivo. Totalizam menos de 1% das neoplasias malignas que comprometem a mama. Possuem a característica de serem assintomáticos e podem atingir grandes dimensões.

Carcinomas: também conhecidos como tumores malignos, possuem origem epitelial e são classificados quanto à localização e extensão em carcinoma *in situ* ou invasivo. Podem ser classificados em ductal ou lobular. O termo “ductal” e “lobular” ainda é utilizado por razões históricas embora não haja evidências que referem a origem do tumor no ducto ou no lóbulo. Atualmente aplica-se essa terminologia apenas para diferenciação dos mecanismos de carcinogênese.

Carcinoma Ductal Invasivo (CDI): possui origem dentro dos ductos com proliferação atípica do epitélio ductal, preenchendo e obstruindo o interior dos ductos com células neoplásicas (Figura 2). Corresponde a 75% dos carcinomas mamários e pode apresentar regiões de necrose e microcalcificação; pode co-existir com o Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS). Possui estroma geralmente fibroso e invadido; forma massa palpável endurecida. É comum apresentar metástases ganglionares quando o tumor é diagnosticado.

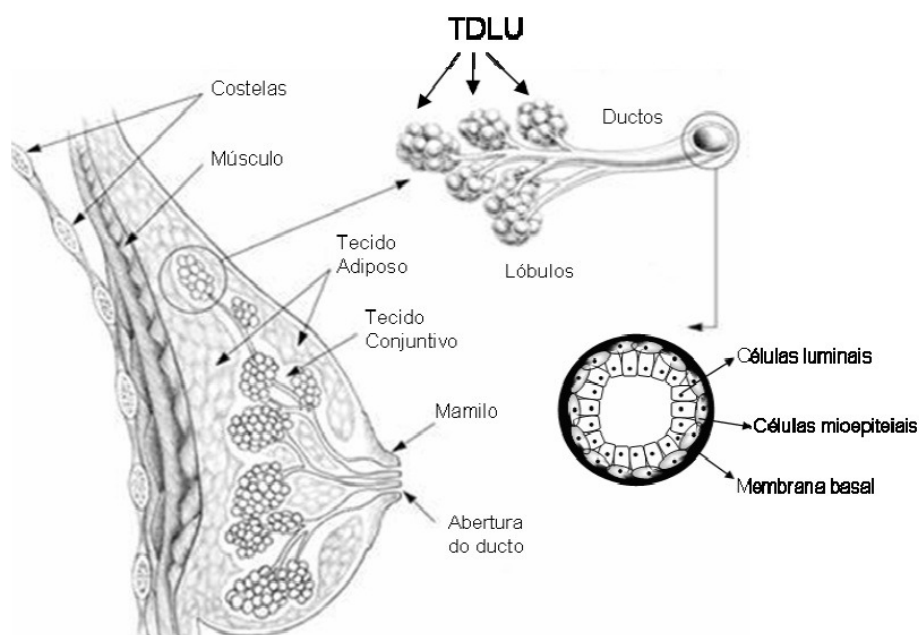


Figura 1: Estrutura mamária. Células ductais compõem as Unidades Terminais Ducto Lobulares (TDLU) Fonte: DIMRI, BAND e BAND (2005).

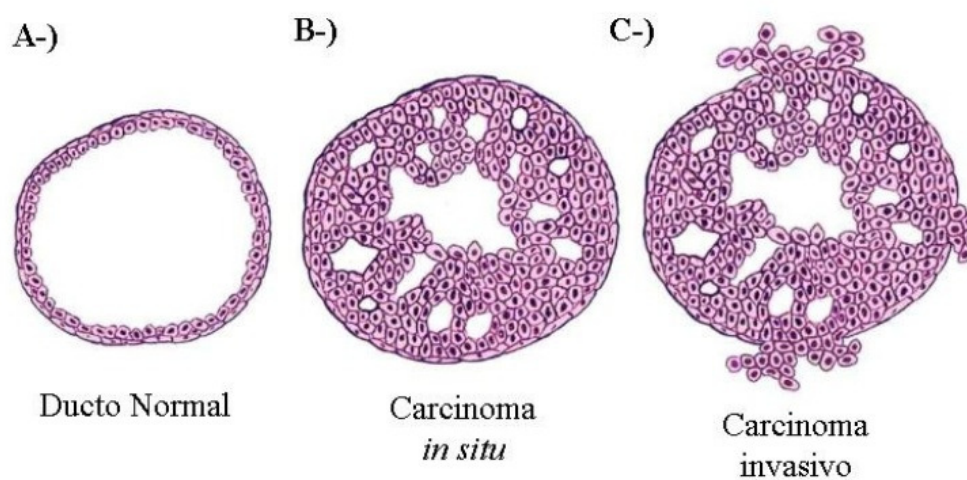


Figura 2: Esquema de progressão tumoral em Câncer de Mama
Fonte: BREAST (2007).

Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS): também possui origem dentro dos ductos com proliferação atípica do epitélio ductal que não invade o estroma.

Carcinoma Lobular Invasivo (CLI): representa cerca de 10% dos casos de câncer de mama, possui bom prognóstico e sobrevida de dez anos em 80 a 90% dos casos. Apresenta-se como uma massa palpável ou lesão mal definida e difusa, sendo, neste caso, dificilmente detectada por mamografia. Em aproximadamente 60% dos casos verifica-se associação desse carcinoma ao carcinoma lobular *in situ*.

Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS): corresponde de dez a 30% dos carcinomas *in situ* e representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do câncer invasor de mama.

Carcinoma Inflamatório: constitui de 1 a 3% dos cânceres de mama e sua apresentação clínica caracteriza-se pelo predomínio dos fenômenos inflamatórios da pele da mama (eritema, aumento da temperatura local e nítido edema com espessamento cutâneo). É uma das formas mais agressivas de câncer de mama. Essa apresentação clínica resulta da embolização tumoral em vasos linfáticos dérmicos.

No diagnóstico, três critérios básicos foram adotados para a determinação do estadio do câncer, conhecido como sistema de classificação TNM, criado pela AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) e UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). Esse sistema baseia-se em: Tamanho do tumor (T); Acometimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástases distantes (M). Dentre os três critérios, o tamanho do tumor e a presença de metástases em linfonodos axilares destacam-se por serem considerados fatores de relevância para prognóstico (CORTESI *et al*, 2012)

2.2 EPIGENÉTICA E O CÂNCER

A herança da informação baseada nos níveis de expressão gênica é conhecida como epigenética, que é considerada o oposto da genética, onde a informação transmitida é baseada na sequência gênica (ESTELLER, 2005). A informação epigenética não é codificada pela sequência de DNA e sim por modificações reversíveis do DNA e/ou histonas, as quais podem ser transmitidas das células mãe para as células filhas (WEBER *et al*, 2007). Durante a tumorigênese ocorre uma perda progressiva de metilação no DNA global enquanto que, na região promotora acontece a hipermetilação do DNA, além disso, essa hipometilação genômica global pode acarretar em instabilidade genômica. Anormalidades epigenéticas não somente ocorrem como eventos secundários, mas são passíveis de acontecer em todos os estágios da tumorigênese, sendo em vários casos, considerados como evento inicial. As principais alterações epigenéticas que ocorrem durante o desenvolvimento de um tumor são: anormalidade na metilação (hipermetilação) de genes supressores tumorais e modificações nas histonas da cromatina (MOMPARLER, 2003; EHRLICH, 2006; DOBROVIC *et al*, 2009).

A metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético que ocorre nos sítios CpG e não CpG e está diretamente envolvido com a regulação gênica. Os sítios CpG estão agrupados em ilhas, as quais são tipicamente encontradas na região promotora dos genes (WEBER *et al*, 2007). A Ilha CpG é definida como uma região de DNA maior do que 200 pares de bases que contenha pelo menos 50% do somatório de guanina e citosina em sua sequência e uma razão entre o observado e esperado da frequência de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6. Em câncer humano, essa modificação não-genética, que pode ser herdada, consiste em um poderoso mecanismo responsável pela inibição de diferentes tipos de genes, incluindo os genes supressores de tumor (DOBROVIC *et al*, 2009).

A metilação do carbono 5 das citosinas é uma característica referente à genomas eucariotos. Cerca de 60-90% dos dinucleotídeos CpG espalhados ao longo do genoma encontram-se metilados, ao passo que nas Ilhas CpG encontram-se não-metilados. Em uma situação de câncer, acontece o inverso.

A região promotora do gene onde se encontra a Ilha CpG possui diversos dinucleotídeos CpG metilados, enquanto que o restante do gene permanece não-metilado. O fato de essas ilhas serem localizadas preferencialmente nas regiões promotoras dos genes sugeriu um papel importante destas regiões na regulação da expressão gênica. Em linhas gerais, a presença da metilação nas ilhas CpG das regiões promotoras dos genes pode ser fortemente associada ao silenciamento gênico (ESTELLER, 2005).

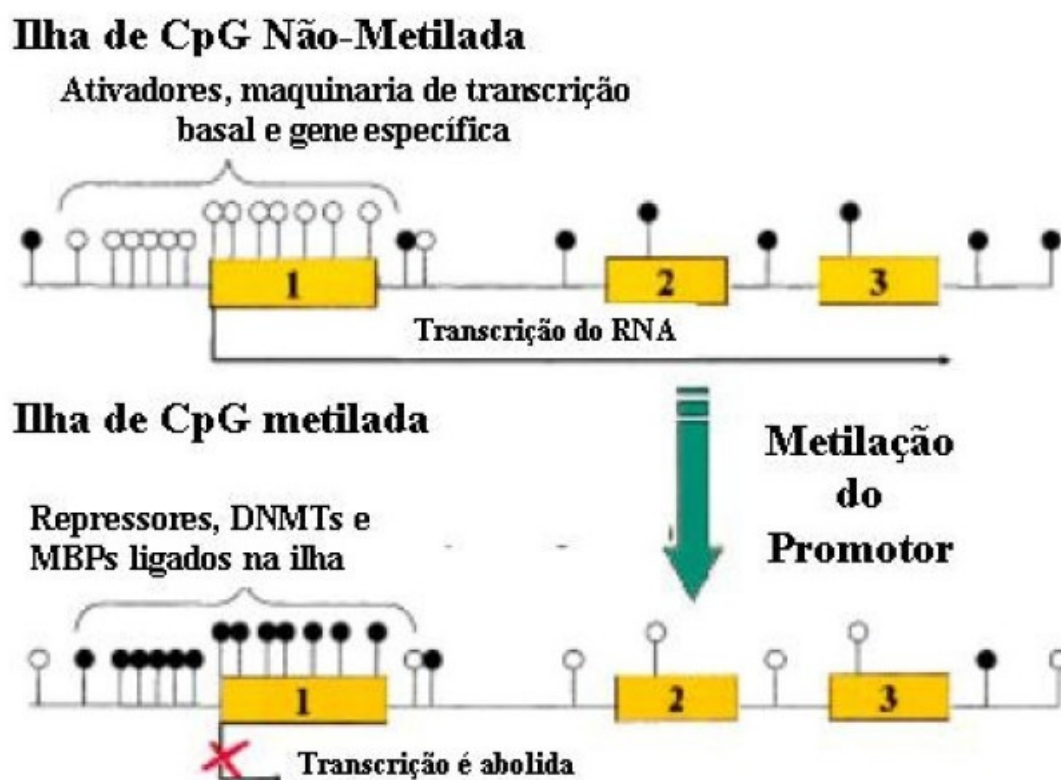


Figura 3: Representação esquemática das Ilhas CpG em genes supressores tumorais. Os pontos brancos representam dinucleotídeos CpG não-metilados enquanto os pontos pretos representam dinucleotídeos CpG metilados. Os retângulos ilustram os exons dos genes supressores de tumor. Na primeira situação a transcrição do gene ocorre normalmente; O segundo caso mostra o silenciamento gênico provocado pela metilação do DNA. Fonte: ESTELLER (2005).

Ainda não se sabe como o mecanismo epigenético de metilação da região promotora do DNA atua no silenciamento gênico, embora existam

algumas teorias propostas visando a explicação do evento. Em uma delas, autores relatam que o radical metil acoplado ao carbono 5 dos dinucleotídeos CpG teria um papel fundamental na interação entre os fatores de transcrição e os seus sítios de ligação, já que o grupamento metil encontra-se situado no sulco maior da dupla fita de DNA. Além dessa interferência direta, uma segunda teoria propõe que a metilação dos dinucleotídeos CpG tenha consequência direta no posicionamento nucleossomal precedendo a montagem dessa estrutura. Assim, com o nucleossomo compactado, o silenciamento da transcrição ocorre de uma maneira mais eficiente se comparado com a estrutura convencional da cromatina (ESTELLER, 2005)

Embora apenas 10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários, acredita-se que os genes envolvidos no processo de carcinogênese desempenhem papel importante também nos casos esporádicos. Em linhas gerais, a aquisição de alterações genéticas (mutações, polimorfismos) ou epigenéticas (hipermetilação da região promotora do gene), em genes reguladores do ciclo celular, responsáveis pela apoptose, ou genes de reparo do DNA é fundamental para que a célula ganhe autonomia. Dessa forma, a célula pode se desenvolver independentemente dos controles interno e externo (BERTRAM, 2001).

2.5 BRCA1 e BRCA2

O BRCA1 foi o primeiro gene de susceptibilidade ao câncer de mama, estando no cromossomo 17q21. Subsequentemente, um outro gene, o BRCA2, foi identificado. Ambos são genes supressores de tumor, e se encontram frequentemente inativados no desenvolvimento do câncer de mama, levando ao surgimento de instabilidade genômica, representada por translocações, duplicações e fusões aberrantes entre cromossomos não-homólogos (BOULTON, 2006).

O gene BRCA1 compreende 24 exons, codifica uma proteína com 1863 aminoácidos e apresenta dois domínios conservados, um localizado na região N-terminal e outro na região C-terminal da proteína. Dentre as funções

desempenhadas por este gene, destacam-se atividade de reparo do DNA, regulação transcricional, progressão do ciclo celular e inativação meiótica de cromossomo sexual. Por sua vez, o gene BRCA2 codifica uma das maiores proteínas humanas, com 3418 aminoácidos e funciona no reparo do DNA por recombinação homóloga (BOULTON, 2006). Até o momento, existem mais de 400 mutações listadas no banco de dados BIC (*Breast Cancer Information Core*), as quais estão relacionadas aos genes de susceptibilidade ao câncer de mama e ovário BRCA1/2 (BIC DATABASE, 2011).

Análises da região regulatória 5' do BRCA1 mostraram que o gene possui um promotor munido de uma complexa organização. Nele está contido uma ilha CpG com 30 sítios CpG a qual abrange a região -567 até +44 relativa ao início do sítio de transcrição do exon 1A. Nessa região encontra-se um promotor bi-direcional responsável pela regulação da transcrição dos genes BRCA1 e NBR2 (*Neighborhood gene*), que se encontra 218pb distante do BRCA1. Estudos relatam que esta pequena região rica em sítios CpG situada no flanco 5' do gene BRCA1 mostrou ter uma intensa atividade promotora (XU, 1997).

Aproximadamente 20% dos tumores esporádicos de mama apresentam hipermetilação na região promotora do gene BRCA1. Esses tumores possuem como característica a negatividade para receptores de progesterona, estrógeno e HER-2, os quais apresentam características patológicas similares aos tumores de origem familiar onde foram detectadas mutações germinativas em BRCA1 (WEI *et al*, 2005). Para câncer de ovário, a metilação no promotor do BRCA1 foi associada a um pior prognóstico (WILCOX *et al*, 2005 e SEEBER *et al*, 2012).

Vários estudos tentaram elucidar a participação do gene BRCA 2 no desenvolvimento do carcinoma mamário de origem esporádica (HANSMANN *et al*, 2012, JUWLE *et al*, 2012, GAJ *et al*, 2012). Um possível mecanismo de explicação para a interferência do gene BRCA 2 seria a sua expressão desregulada, já que o mesmo apresentou-se superexpresso em casos de tumores esporádicos de mama (BIECHE *et al*, 1999). Kangjian e colaboradores (2000) mostraram que a expressão do BRCA 2 é mediada entre o fator de

transcrição NF-kB e o promotor do gene sugerindo que o fator de transcrição ativa e induz o BRCA 2 a ser superexpresso.

2.6 p53

O gene p53 encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17p13. O seu mRNA é traduzido em uma proteína de 393 aminoácidos que compreende vários domínios, incluindo uma região ácida N-terminal e um domínio C-terminal com múltiplas funções (GOMEZ-LAZARO, 2004). Além disso, codifica uma proteína com 53 KDa com funções no controle do ciclo celular, apoptose e manutenção da integridade do DNA. Devido à sua importância no controle do ciclo celular e integridade, foi apelidado de “guardião do genoma” (LANE, 1992).

O p53 tem como principal característica a habilidade de ativar genes “downstream” via ligação DNA sequência-específica, modulando assim respostas celulares tais como apoptose e parada do ciclo celular frente a danos no DNA. Mutações e polimorfismos genéticos podem alterar a função do p53 gerando proteínas polimórficas as quais podem provocar desequilíbrios nas principais funções gênicas (ØRSTED *et al.*, 2007; SHU *et al.*, 2007). Até agora, existem 85 polimorfismos descritos referentes ao TP53 com influência direta e indireta em suas vias metabólicas (IARC, 2011). Um dos polimorfismos mais frequentes é o localizado no exon 4 do gene p53, é também conhecido como polimorfismo no códon 72, o qual se caracteriza por ser uma mutação pontual do tipo transversão, onde uma purina é substituída por uma pirimidina. O polimorfismo no códon 72 codifica duas formas alélicas funcionais distintas: Uma é a Arginina (Arg) e a outra é a Prolina (Pro) (THOMAS *et al.*, 1999)

Mutações no p53 são as alterações genéticas mais comuns em câncer humano, sendo encontrada em 20-30% em carcinomas considerados esporádicos (DAMIN *et al.*, 2006). O polimorfismo no códon 72 mostrou-se associado a vários tipos de câncer. A associação entre esse tipo de polimorfismo e os diversos tipos de câncer foram reportados em diferentes populações, embora a maioria dos resultados tenham sido bastante

controversos. Existem vários estudos na literatura os quais abordam essa mutação pontual específica no códon 72 do gene p53 em diferentes grupos étnicos mostrando uma larga gama de variação (CHOSDOL *et al.*, 2002). Um dado curioso, e ainda aceito, foi relatado em 1994 por Beckman e colaboradores reportaram diferenças étnicas sugerindo que o polimorfismo poderia ser mantido através da seleção natural. Nas últimas duas décadas vários estudos (CHOSDOL *et al.*, 2002, DAMIN *et al.*, 2006, ØRSTED *et al.*, 2007; SHU *et al.*, 2007) se propuseram a investigar a associação entre o polimorfismo no códon 72 do gene p53 e o risco de desenvolvimento do câncer de mama em várias populações, porém ainda não exista comprovação que embase tumorigênese associada a esse tipo de mutação.

Mutações no gene p53 estão distribuídas ao longo de toda a região codificante do gene com forte predominância entre os códons 4-9. Aproximadamente 30% de todas as mutações do tipo “codon-hotspot” estão relacionadas a seis códons (175, 245, 248, 249, 273, 282) e são presentes em quase todos os tipos de câncer. Resultados de vários estudos mostraram que o códon 249 constitui um dos sítios mais importantes que atua como “hotspot” em se tratando do TP53. Substituições de base específicas tais como transverso G ->T na terceira posição do códon 249 no exon 7 do gene p53 resulta na substituição da arginina (Arg) por uma serina (Ser). Esse tipo de mutação já está fortemente relacionado ao carcinoma hepatocelular e carcinoma pulmonar (KIRUTHIGA *et al.*, 2012).

2.7 BRCA1/BRCA2/p53

Em relação à interação entre os genes BRCA1 e BRCA2, sabe-se que a transcrição desses dois genes resulta em proteínas que atuam em uma via comum de proteção ao genoma. Estudos demonstram que essas proteínas atuam em diferentes estágios do reparo e resposta ao dano do DNA. O gene BRCA1 expressa uma proteína pleiotrópica que age na ativação do *checkpoint* celular e no reparo do DNA. Já o BRCA2 possui um importante papel no mecanismo de recombinação homóloga. Além de sua importância na

variabilidade genética, o mecanismo de recombinação homóloga também pode atuar no reparo do DNA quando este é submetido à quebra da dupla fita de DNA. Embora a ligação entre as duas proteínas ainda não tenha sido claramente elucidada, acredita-se que tal interação seja fundamental na susceptibilidade ao câncer de mama quando esses genes se encontram mutados (ROY *et al*, 2012).

Células com perda da função de BRCA1/BRCA2 tendem a ser hipersensitivas a agentes que danificam o DNA, provocando o rompimento da dupla fita. Na ausência desses mecanismos de reparo, a célula busca outras alternativas de reparação utilizando mecanismos como junção de terminais não-homólogos (*non-homologous end joining* - NHEJ) que é mediado pela enzima DNA ligase IV resultando em rearranjos cromossômicos e instabilidade. Essa instabilidade gênica é crucial para o desenvolvimento da carcinogênese (LALOO, 2012).

Três grupos de alelos foram identificados como fatores de risco para o câncer de mama. O primeiro grupo está relacionado a alto risco e compreende os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *p53*, conferindo 40-85% de risco de desenvolvimento do câncer em algum estágio da vida. O segundo grupo corresponde aos genes *PALB1*, *BRIP1*, *ATM* e *CHEK2* que são classificados como moderados, representando 20-40% de risco e como terceiro grupo, um conjunto de alelos identificados através de estudos de associação genômica (LALLO, 2012).

Modelos de estudo com camundongos apontam a ativação de checkpoint dependente, em parte, de p53 em tumores com perda de BRCA1/BRCA2. Este evento ocorre por parada do ciclo celular na fase G1, resultado, a princípio, da atividade do gene p21^{Waf1}, que é regulado por p53. Extrapolando tais resultados para o câncer de mama humano, pode-se dizer a exclusão deste ponto de regulação mediado por mutações em p53, eliminaria a capacidade de ativação deste checkpoint. Portanto, a frequência e o espectro de mutação de p53 identificados em tumores de mama, deram indícios de que a perda da função de reparo do DNA por BRCA1/BRCA2, pode facilitar a

geração, ou talvez a seleção, de mutações somáticas, as quais contribuem para a tumorigênese da mama (ROY *et al*, 2012).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Asp. Med.**, n.21, p. 167-223, 2001.

BIECHE, I., NOGUES, C., AND LIDEREAU, R. Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours.(1999) **Oncogene** 18, 5232–5238

BIRD, AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature** 321: 209-213, 1986.

BOULTON, S.J. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. **Biochemical Society Transactions**. Volume 34, part 5 (2006).

BREAST cancer invasive? Disponível em:
<http://www.breastcancer.org/is_cancer_invasive.html>. 2007

Breast Cancer Information Core (BIC) database.
<http://research.nhgri.nih.gov/bic/> (2011).

CORTESI L, MARCHESELLI L, GUARNERI V, CIRILLI C, BRAGHIROLI B, TOSS A, SANT M, FICARRA G, CONTE PF, FEDERICO M. Tumor size, node status, grading, HER2 and oestrogen receptor status still retain a strong value in patients with operable breast cancer diagnosed in recent years. **Int J Cancer**. 2012 Aug 23. doi: 10.1002/ijc.27795.

DAMIN, A.P.S., FRAZZON, A.P.G., DAMIN, D.C., ROEHE, A. *et al*. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. **Cancer Detection and Prevention** 30 (2006) 523–529

DESIGNED UNIVERSE. Methylation of CpG Island in DNA.
<http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel_Prize/methylation.jpg>.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 171-179, 2005.

ESTELLER, M. CpG islands hipermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, p. 5427-5440, 2002.

ESTELLER, M., SILVA, J.M., DOMINGUEZ, G., BONILLA, F., MATIAS-GUIU, X., LERMA, E., BUSSAGLIA, E., PRAT, J., HARKES, I.C., REPASKY, E.A. et

al. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J. Natl. Cancer Inst.**, 92, 564–569.

ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 629-656, 2005.

GAJ P, KLUSKA A, NOWAKOWSKA D, BAŁABAS A, PIĄTKOWSKA M, DABROWSKA M, NIWIŃSKA A, OSTROWSKI J. High frequency of BRCA1 founder mutations in Polish women with nonfamilial breast cancer. **Fam Cancer**. 2012 Aug 4.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.**, v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GREENBLATT, M.S, PIERRE O. C., JEFFREY P. B., *et al.* *TP53* Mutations in Breast Cancer Associated with *BRCA1* or *BRCA2* Germ-line Mutations : Distinctive Spectrum and Structural Distribution. **Cancer. Res.** 2001;61:4092-4097.

JAENISCH, R. and BIRD, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, 33 (suppl.), 245–254.

JUWLE A, SARANATH D. BRCA1/BRCA2 gene mutations/SNPs and BRCA1 haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity. **Med Oncol**. 2012.

KANGJIAN, W.U., SHI-WEN JIANG, MUTHUSAMY THANGARAJU, GUOJUN WU, AND FERGUS J. COUCH. Induction of the BRCA2 Promoter by Nuclear Factor-kB **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 275, No. 45, Issue of November 10, pp. 35548–35556, 2000.

LACERDA, L.L., SERRANO, S.V., MATHES, A. *et al.* An intronic variant in the *TP53* gene in a Brazilian woman with breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 160 (2005) 160–163.

LALLOO, F., EVANS, D.G. Familial breast cancer. **Clin. Genet.** (2012)

LANE, D.P. p53, guardian of the genome. **Nature**. 1992 Jul 2;358(6381):15-6

LARSEN, F., GUNDERSEN GAND PRYDZ H. Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. **Genet. Anal. Tech. Appl.** 9: 80-85, 1992.

MOMPARLER, R.L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, p. 6479-6483, 2003.

NYGREN, A. O. H., NAJIM, A., HELENA M. B. D., RAYMON N. C. P. VIJZELAAR, QUINTEN W., CORINE J. H., JAN P. S., ABDELLATIF, E. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. **Nucleic Acids Research**, 2005, Vol. 33, No. 14 e128.

ØRSTED, D.D., BOJESEN, S.E., TYBJAERG-HANSEN, A., NORDESTGAARD, B.G. 2007 Tumor supressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. **J. Exp. Med.** 204 1295–1301

RAIZIS, A.M., FREDERIC, S., JEAN-PIERRE, J. A Bissulfite method of 5-Methylcytosine mapping that minimizes template degradation. **Analytical Biochemistry** 226, 161-166. 1995.

RICE, J.C., OZCELIK, H., MAXEINER, P., ANDRULIS, I. AND FUTSCHER, B.W. (2000) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. **Carcinogenesis**, 21, 1761–1765.

SEEBER, L.M. AND VAN DIEST, P.J. (2012) Epigenetics in ovarian cancer. **Methods Mol. Biol.**, 863, 253–269.10699.

SHU, K., LI, B., WU, L.X. 2007 The p53 network: p53 and its downstream genes. **Colloids. Surf. B. Biointerfaces** 55 10–18

THOMAS, M., KALITA, A., LABRECQUE, S., PIM, D., BANKS, L., MATLASHEWKI, G. 1999 Two polymorphic forms of wild type p53 differ biochemically and biologically. **Mol. Cell Biol.** 2 1092–1100

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; KOLAR, Z. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v. 151, n. 1, p. 59-64, 2007.

WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M.B., RAMOS, L., PA"ÁBO, S., REBHAN, M. and SCHU"BELER, D. (2007) Distribution, silencing potential

andevolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nat. Genet.**, 39, 457–466.

WEI, M., GRUSHKO, T.A., DIGNAM, J., HAGOS, F., NANDA, R., SVEEN, L., XU, J., FACKENTHAL, J., TRETIAKOVA, M., DAS, S. et al. (2005) BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. **Cancer Res.**, 65, 10692–10699.

WILCOX, C.B., BAYSAL, B.E., GALLION, H.H., STRANGE, M.A. AND DELOIA, J.A. (2005) High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 59, 114–122.

WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, QUIRK Y, FORD D, COLLINS N, NGUYEN K, SEAL S, TRAN T, AVERILL D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, brca2, to chromosome 13Q12-13. **Science** 30 September 1994:Vol. 265. no. 5181, pp. 2088 – 2090

XU, C.F., BROWN, M.A., NICOLAI, H., CHAMBERS, J.A., GRIFFITHS, B., SOLOMON, E. Isolation and characterisation of the NBR2 gene which lies head to head with the human BRCA1 gene. **Hum. Mol. Genet.** 6: 1057-1062, 1997.

XU, C.F., CHAMBERS, J.A., SOLOMON, E. Complex regulation of the BRCA1 gene. **Journal Biol. Chem.** 272: 20994-20997, 1997.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar as alterações dos genes p53, BRCA1 e BRCA2 em Carcinoma Ductal Invasivo de mama humana (CDI) familiares e esporádicos.

4.2 Específicos

- Correlacionar as mutações no gene p53 com as alterações observadas em BRCA1 e BRCA2;
- Correlacionar alterações e mutações com os dados clínico-patológicos de biópsias de carcinoma ductal invasivo familiar e esporádicos

5 ARTIGO CIENTÍFICO



A ser submetido ao periódico *Pathobiology*, fator de impacto 1.909.

**ASSESSMENT OF CHANGES IN THE *BRCA2* AND *p53* GENES IN BREAST
INVASIVE DUCTAL CARCINOMA IN NORTHEAST BRAZIL**

Eduardo Augusto V de Freitas Ramalho^a João Luiz Q da Silva Filho^a Marina
Falcão de S Cartaxo^a Carmelita Bezerra de L Cavalcanti^a Moacyr Jesus B de
Melo Rêgo^a Maria Betânia M de Oliveira^b Eduardo Isidoro C Beltrão^{a,b}

^aKeiso Azami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco,
Pernambuco, Brazil;

^bBiochemistry Department, Federal University of Pernambuco, Pernambuco,
Brazil

Correspondence to: Eduardo Beltrão

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE - 50670-901
Brazil

Tel: +55 81 2101.2504

Fax: +55 81 21268484

Email: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to evaluate epigenetic changes in promoter regions of BRCA2 gene using Methylation Specific PCR (MSP) technique and correlate with mutations in exons 4 and 7 of p53 gene with clinical and pathological data from breast cancer patients from Recife, Northeast Brazil.

Methods: Fifty breast formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies diagnosed as Invasive Ductal Carcinoma (IDC) were obtained from the Pathology Sector at Hospital das Clínicas HC-UFPE. Samples were subjected to DNA extraction and amplification by MSP. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was used to exons 4 and 7 p53 polymorphisms verification using *Bst*UI and *Hae*III enzymes, respectively. **Results:** BRCA2 methylation frequency was 46.9%. Frequency of p53 codon 72 polymorphism was 32% for Pro72 allele in homozygous while for heterozygous it was 60%. Arg72 allele frequency was 8%. Comparison of the profiles Arg72 and Pro72 conferred protection ($p=0.004$ OR=0.0338) and risk $p=0.046$ OR=4.190) for Pro72 versus heterozygote profile, both in parameter metastasis. Concerning exon 7 codon 249 the mutation frequency was 8.16% to Ser249 allele. **Conclusion:** Among all parameters analyzed Arg72 was statistically correlated with metastasis being indicated as bad prognosis auxiliary biomarker of invasive ductal carcinoma in our study population.

Key Words: BRCA2, epigenetics, p53, polymorphism, breast cancer.

INTRODUCTION

It is well known that BRCA2 gene encode functionally related proteins that play critical roles in DNA double-strand breaks repair [1–3]. BRCA protein interacts with at least 13 different proteins that have been implicated with cancer susceptibility, suggesting that BRCA gene works as an essential signaling network dedicated to genome integrity [4-8]. Loss of BRCA function results in development of chromosomal instability and this 'BRCAness' (loss of BRCA function or BRCA-null) phenotype correlated to sensitivity to DNA cross-linking agents in preclinical models [9–11].

In contrast to non-coding regions of the genome where most CpGs are methylated, CpG islands in 5' cis-regulatory regions of genes are usually unmethylated. Methylation of these CpG islands during the development or disease processes is associated with post-translational histone modifications that lead to a locally condensed inactive chromatin structure and gene silencing [12, 13]. During tumorigenesis, there is a progressive loss of global DNA methylation and at the same time regional hypermethylation [14]. Tumor-specific hypermethylation of CpG islands in 5' promoters can inactivate genes for DNA repair, cell cycle control and other mechanisms that prevent neoplastic transformation in a normal cell [15]. Epigenetic abnormalities do not only occur as secondary changes at all stages of tumor evolution, but can also act as initiating events [16].

As a diagnostic technique methylation-specific PCR (MSP) could be highlighted [17]. The precise mapping of DNA methylation patterns in CpG islands has become essential for understanding many biological processes such as gene regulation, X chromosome inactivation and silencing of tumor suppressor genes. The MSP technique can quickly assess the methylation pattern of virtually any promoter region which contains therein one or more CpG islands. MSP is sensitive to 0.1% methylated alleles of a particular CpG island and can be also performed in formalin-fixed paraffin-embedded tissues the most common sample presentation for diagnosis. Early detection of aberrant methylation in carcinogenesis related genes may be essential for diagnosis, prognosis and/or detection of metastatic potential [17].

DNA methylation is an important epigenetic mechanism that occurs in CpG and non CpG sites and is directly involved in gene regulation [18-22]. In human cancer, such non-genetic modification which can be heritable consists in a powerful mechanism responsible for the inhibition of different genes, including tumor suppressor genes [23].

The tumor suppressor gene p53 plays a major role in control of the cell cycle, apoptosis and maintenance of DNA integrity. Due to its importance in cell cycle control and integrity, it was nicknamed "genome guardian" [24, 25]. Mutations and genetic polymorphisms may alter the function of p53 proteins leading to imbalances in the major gene functions [26, 27].

This study analyzed BRCA2 promoter region methylation pattern and p53 SNP's and correlated with clinic-pathological parameters such as age, tumor size, lymph node involvement and metastasis of patients from Recife, Pernambuco, Northeast Brazil.

METHODS

Samples

Fifty formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC) and five normal tissues (from reducing mastoplasty) were obtained from Anatomy Pathology Service of Hospital das Clínicas at Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. This study was approved by the Health Science Center Bioethical Board of UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE No 195/09). Exclusion criteria included patients under 30 year-old and samples with different types of carcinoma besides IDC. Clinical and pathological parameters such as: age, tumor size, lymph node invasion and metastasis were evaluated.

DNA isolation

Ten sections (10x2µm) of each biopsy were placed into an Eppendorf tube (2 mL) for deparaffinization. Xylene (1 mL) was added, mixed (40-50 seconds) and samples incubated at 25°C for 30 min (vortexed every 10 min). Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 3 min and xylene was discarded. Ethanol (1mL) was added and mixed by inversion followed by centrifugation at

14,000 rpm for 3 min. Ethanol was removed and ethanol/centrifuge process was repeated. The supernatant was discarded and the samples were dried using a vacuum centrifuge. After drying, samples received 400µL of cell lysis buffer (0.5M EDTA, 5M NaCl, 1M Tris), 36µL of SDS (20x), 24µL of Proteinase K (20mg/mL) and 20µL of MilliQ water. Samples were incubated at 65°C in a water bath for 18 h. After that 420µL of 5M NaCl solution was added and samples were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min. Supernatant was transferred to an Eppendorf tube, and 800µL of cold isopropyl alcohol was added followed by centrifugation at 14,000 rpm for 20 min. Supernatant was discarded and ethanol (500µL) was added and vortexed. Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min and the supernatant was discarded. DNA was vacuum centrifuge dried, dissolved in 100µL of TE buffer and stored at -20°C until use.

Identification of CpG islands in the promoter region of *BRCA2* gene

Methyl Primer Express[®] software (Applied Biosystems) was used in order to identify CpG islands and design primers for the MSP technique. Methylation specific primers were designed to the promoter region in exon 1 in the 5' untranslated region of the *BRCA2* gene. Primers for amplification were as follows: *BRCA2* Methylated Forward (5'- AAATTAGGCGGTAGAGGC-3'), and Reverse (5'- ATAAACTAACAAAAACCGCG-3'), *BRCA2* Unmethylated Forward (5'- TTGAAATTAGGTGGTAGAGGT-3') and Reverse (5'- AAATAACTAACAAAAACCCACAC-3').

Bisulfite treatment

Bisulfite treatment of genomic DNA (2µg) was carried out using Epitect Bissulfite Kit (QIAGEN) following manufacturer's instructions.

***BRCA2* Methylation analysis (MSP)**

All MSP reactions were performed using GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) following the manufacturer's instructions. It was used 0.4µM of each primer and 50ng of DNA template (final volume reaction was 12.5µL).

Amplification conditions were: BRAC2 methylated allele (hot start at 94 °C for 5 min followed by 40 cycles of 94 °C for 50 sec, 51 °C for 40 sec and 72 °C for 45 sec); BRCA2 unmethylated alleles (hot start at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 45 sec, 50 °C for 40 sec and 72 °C for 45 sec). In all MSP reactions was performed a 5 min final extension. Reaction products were separated by electrophoresis on 1% agarose/Sodium borate, stained with ethidium bromide (0.5µg/mL) and photodocumented in LPIX (Loccus Biotechnology). For BRCA2 gene were expected 139 bp amplicons to both methylated and unmethylated alleles. As a control for the methylated-specific primers, SssI methylase-treated DNA was used to generate a full methylated DNA at all of the CpG sites. Water was used as template in negative control.

p53 Polymerase Chain Reaction (PCR)

All PCR reactions were performed using GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) following the manufacturer's instructions. Primers were obtained according to IARC TP53 Database where exon 4 was amplified using 0.4µM of each primer: forward (5'-TGCTCTTTTCACCCATCTAC-3') and reverse (5'-ATACGGCCAGGCATTGAAGT-3') and for exon 7 it was used 0.4µM of each primer: forward (5'-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3') and reverse (5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3'). In both reactions it was used 50ng of DNA template (final reaction volume = 12.5µL). The expected amplified products were 353bp for exon 4 and 177bp for the exon 7. Amplicons were evaluated on 1% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide (0.5µg/mL). Amplification conditions were hot start at 94 °C for 2 min followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 45sec and 72 °C for 45sec with a final extension at 72 °C for 5 min.

p53 RFLP

It was used 0.5 µL (10 units) of enzyme *Bst*UI (Biolabs), 2µL of 1x buffer, 15µL of DNA fragment and 2.5µL of nuclease free water (total volume of 20µL). Reactions were carried out for 2h at 60 °C in the thermocycler. Restriction products were electrophoresed on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (0.5µg/mL). The 177pb fragment derived from exon 7 of the p53 gene was digested using 0.5µL (5 units) of the *Hae*III (Biolabs), 2µL of 10x buffer,

15µL of DNA fragment and 2.5µL of nuclease free water (total volume of 20µL). Reactions were developed for 2h at 37°C followed for 20 min at 80°C for enzyme activity inhibition. Resulting fragments were evaluated on a 2% agarose gels and stained with ethidium bromide (0.5µg/mL).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5. The contingency analysis was used to compare the associations of categorical variables and p values were derived from the method of chi-square. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

BRCA2 MS-PCR

DNA samples extracted from fifty biopsies from patients diagnosed with IDC and five healthy controls were subjected to MS-PCR amplification and DNA quantification was performed by Nanodrop2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and the amount of DNA was approximately 50ng/µl for each sample. The frequency of BRCA2 promoter methylation in IDC patients corresponded to 46.9% (Figure 1). However no correlation with clinical-pathological data could be established.

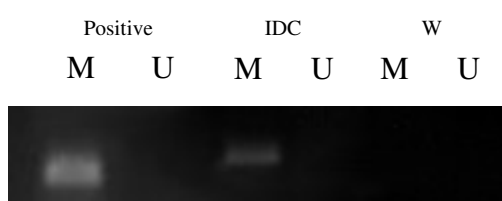


Figure 1: Methylation status of BRCA2 gene in biopsies of Invasive Ductal Carcinoma (IDC) detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR). Positive control: DNA from human blood treated by SssI Methylase; M: Methylation allele band (139bp). U: Unmethylation. W: Nuclease free water (blank control).

p53 gene PCR

Amplified products of exon 4 and exon 7 were 353bp and 177bp, respectively. PCR-RFLP of p53 gene codon 72 polymorphism was positive in all cases. The Arginine allele was cleaved by BstUI resulting in two smaller fragments (214pb and 139pb). On the other hand Proline allele resulted in a single band of 353bp. Heterozygous samples showed a three bands pattern (353, 214 and 139pb) (Figure 2a). PCR-RFLP of p53 codon 249 mutations showed that exon 7 presented four fragments (92, 62, 23 and 12pb). The Serine249 genotype showed loss of restriction site for HaeIII yielding an uncleaved fragment of 154bp. The frequency of the Proline72 allele was 31.25%. Differing from heterozygous pattern that was 66.6% while the frequency of the Arginine72 was of 2% and Serine249 allele 8.16%. Among all parameters analyzed according to Arg72 genotype Pro/Pro72 were associated with metastasis in relation to Arg/Pro72 and Arg/Arg72 shows metastasis protective effect in relation to Pro/pro72 genotype.

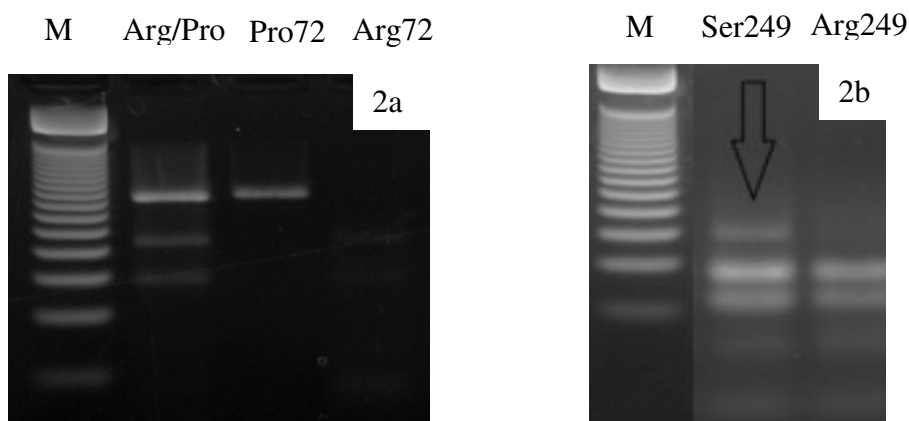


Figure 2: a) PCR-RFLP Analysis of the *p53* Gene Exon 4 (codon 72). M = Molecular weight marker (50bp), 1: heterozygous pattern Arg / Pro; 2: proline allele not cleaved by *Bst*UI showing the 353pb band; 3: The arginine allele cleaved by the enzyme resulting in two fragments (214 and 139bp). b) PCR-RFLP Analysis of the *p53* Gene Exon 7 (codon 249) Exon 7. M: Molecular weight marker (50bp); 4: Arrow indicate the fragments corresponding to 249Ser allele (154pb) not cleaved by *Hae*III. 5: Enzyme digestion fragments showing the arginine allele with 92 and 62bp.

p53 RFLP

Detection of p53 gene codon 72 polymorphism by PCR-RFLP was successfully conducted in all cases and controls (Figure 2). *Bst*UI digestion of Arginine allele yielded two fragments (214 and 139 bp) while for the Proline allele yielding a single 353 bp product. In heterozygous samples it was observed three bands (corresponding to 309, 214 and 139 bp) after *Bst*UI digestion. *Bst*UI was used in order to evaluate codon 72 polymorphisms and *Hae*III enzyme to codon 249 polymorphisms. In p53 codon 249 mutant detection the wildtype 249 genotype was cleaved by *Hae*III, yielding 4 fragments (92, 62, 23 and 12 bp) and the Serine249 genotype lost the *Hae*III restriction site and it was not cleaved presenting 154, 92, 62, 23 and 12 bp (Figure 2b). For codon 72 polymorphism, the results showed a 32% frequency of homozygous for the pro72 allele, 8% homozygous for the arg72 allele and 60% for the heterozygous arg/pro pattern. It was found a strong association between the two profiles Arg72 and Pro72 (p-value 0.004) for that suggesting that homozygous Pro72 pattern is related as protective factor for metastasis.

DISCUSSION

The frequency, time and spectrum of p53 gene mutation may be useful to provide clues to the etiology and pathogenesis of human cancer. Several studies proposed the role of codon 72 polymorphism as a risk factor for different types of cancers such as stomach, lung and bladder [28]. Our findings showed a low prevalence of homozygosity for Arg in patients with breast cancer in opposition to results found in cases from Greece [29], Turkey [30] and in Southern Brazil [31]. These results can be reflecting the high heterozygosity of Northeast Brazilian population mainly as consequence of the colonization history (Europeans, Africans and Brazilian Indians).

Our findings demonstrate a 60% frequency related to Arg/Pro allele but no association with breast cancer risk. However, these data suggest a relative association between heterozygous pattern and metastasis ($p = 0.046$) which may be related to risk factor for metastasis since this feature was observed in patients with a more aggressive phenotype, being more genetically unstable and more susceptible for metastasis. Opposite results were found regarding the involvement of Arg/Pro heterozygous variant and increased breast cancer risk

in North Indian population [26]. And another study reported that Proline homozygosity at p53 codon 72 is associated with decreased breast cancer risk in Arab women [32].

Polymorphism at codon 72 in p53 gene affects its function. Arg72 is more susceptible to degradation by human papillomavirus (HPV) E6 type-18 protein and suppresses cellular transformation more effectively than Pro72. On the other hand Arg72 is more efficient than Pro72 to induce apoptosis [27]. So far, there are no results that can support any proposed theory on the role of codon 72 polymorphism as risk factor for breast cancer, thus remaining inconclusive. Our analysis of exon 7 codon 249 revealed that 18% of breast cancer patients have mutation, which is not significant. Codon 249 mutation has shown no statistic significance between any parameters chosen in this study. Our findings are in accordance with studies in Indian population showing that codon 249 polymorphism have no relation as risk factor for breast cancer [25].

There are no doubts about the importance of methylation pattern in BRCA2 promoter region in breast and ovarian carcinoma [33]. Our findings demonstrate a 46.9% methylation in promoter region of BRCA2. However we found no association between methylation status and clinical pathological data. The analysis of clinic-pathologic parameters of our samples showed that this polymorphism is related to the metastasis status of breast IDC in the population evaluated (data not shown) in this case polymorphism in p53 showed statistical significance for the parameter metastasis to risk ($p=0.046$; $OR=4.190$) homozygote Pro72 versus heterozygote Arg/Pro profile and protection ($p=0.004$; $OR=0.0338$) homozygote Arg72 versus Pro72 profile. BRCA2 and p53 genes being extensively studied worldwide, we know that in some medical centers already perform genetic tests for evaluation of germline mutations in BRCA2 for genetic counseling, but little is known about the epigenetic profile if would be a useful auxiliary tool in cancer diagnosis. Our results showed that among all parameters analyzed Arg72 compared with Pro72 was statistically significant for metastasis which could be indicated as potential auxiliary biomarker of bad prognosis on invasive ductal carcinoma.

Acknowledgments: This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERENCES

1. Venkitaraman AR: Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*; 2009 4:461–487.
2. Tutt A, Ashworth A: The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol. Med.* 2002 8:571–576.
3. Karran, P: DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Gen Dev* 2000 10:144–150.
4. Solyom, S: Breast cancer-associated Abraxas mutation disrupts nuclear localization and DNA damage response functions. *Sci. Transl. Med.* 2012 4, 122ra23
5. Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, Kallioniemi A, Pylkäs K, Karppinen SM, Rapakko K, Miron A, Sheng Q, Li G, Mattila H, Bell DW, Haber DA, Grip M, Reiman M, Jukkola-Vuorinen

- A, Mustonen A, Kere J, Aaltonen LA, Kosma VM, Kataja V, Soini Y, Drapkin RI, Livingston DM, Winqvist R: A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 2007 446:316–319
6. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR: PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet* 2007 39:165–167
 7. Seal S, Thompson D, Renwick D, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N: Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet.* 2006 38:1239–1241
 8. Nikkilä J, Coleman KA, Morrissey D, Pylkäs K, Erkkö H, Messick TE, Karppinen SM, Amelina A, Winqvist R, Greenberg RA: Familial breast cancer screening reveals an alteration in the RAP80 UIM domain that impairs DNA damage response function. *Oncogene* 2009 28:1843–1852
 9. Tassone P, Di Martino MT, Ventura M: Loss of BRCA1 function increases the antitumor activity of cisplatin against human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Biol* 2012 8:648–653.
 10. Powell SN, Kachnic LA: Therapeutic exploitation of tumor cell defects in homologous recombination. *Anticancer Agents Med Chem* 2008 8:448–460.
 11. Chirnomas D, Taniguchi T, de la Vega M: Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther* 2006 5:952–961.

12. Nygren AOH, Najim A: Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005 33:124-128.
13. Esteller M: Aberrant DNA Methylation as a cancer-inducing mechanism. *An Rev Pharmacol Toxicol* 2005 45:629–56
14. Momparler RL: Cancer Epigenetics. *Oncogene* 2003 Sep 29;22(42):6479-83
15. Bird, AP: CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986 321:209-213.
16. Larsen F, Gundersen G, Prydz H: Choice of enzymes for mapping based on CpGislands in the human genome. *Genet Anal Tech Appl* 1992 9:80-85.
17. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996 93 9821-9826
18. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordán JJ: p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem* 2004 60(4):287-307.
19. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 2005 358(6381):15-6.
20. Ørsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG: Tumor supressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J Exp Med* 2007 204:1295–1301.

21. Shu K, Li B, Wu, LX: The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2007 55:10–18.
22. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M: Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007 Jun;28(6):622-9. R15 November 2010
23. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G: Two polymorphic forms of wild type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 2001 2:1092–1100.
24. Chosdol K, Ahuja A, Rathore A: Study of p53 codon 72 polymorphism in various ethnic groups of North India. *Curr Sci* 2002 82:1253-1255.
25. Vijayaraman KP, Veluchamy M, Murugesan P: p53 Exon 4 (codon 72) Polymorphism and Exon 7 (codon 249) Mutation in Breast Cancer Patients in Southern Region (Madurai) of Tamil Nadu. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012 13:511-516.
26. Damin APS, Frazzon APG, Damin DC: Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2006 30: 523-9.
27. Pharoah PD, Day NE, Caldas C: Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999 80(12):1968-73.
28. Hussain SP, Amstad P, Raja: Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001 61(17):6350-5.
29. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M: The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T

- polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Let* 2005 222(1):57-65.
- 30.Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA: p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000 3:389-2.
- 31.Buyru N, Tigli H, Dalay N: p53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 2003 10(3):711-4.
- 32.Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, Abdulaziz Z, Rafeek M, Akil N, Alkhalaf M. P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. *Med Oncol* 2011 Sep;28(3):709-15
- 33.Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 1997;76:1150–6.

CONCLUSÕES

- A análise do perfil de metilação do gene BRCA2 foi estatisticamente significativa quando comparado ao gene BRCA1;
- A análise de restrição dos polimorfismos referentes ao gene supressor de tumor p53 mostrou-se uma ferramenta promissora para a genotipagem dos sítios avaliados;
- A análise dos parâmetros clínico-patológicos mostrou que o polimorfismo para Arg72 foi estatisticamente significativa para metástase se mostrando um potencial biomarcador auxiliar no diagnóstico de carcinoma ductal invasivo não-hereditário.
- Não foram encontradas correlações entre a metilação e o polimorfismo dos genes estudados quanto a idade das pacientes e tamanho dos tumores.