

RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

INSTABILIDADE GENÔMICA EM NEOPLASIAS MALIGNAS DA MAMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO INTRACELULAR

GENOMIC INSTABILITY ASSOCIATION WITH INTRACELLULAR ALUMINUM CONCENTRATION IN BREAST TUMORS

CAMPINAS 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

INSTABILIDADE GENÔMICA EM NEOPLASIAS MALIGNAS DA MAMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO INTRACELULAR

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

GENOMIC INSTABILITY ASSOCIATION WITH INTRACELLULAR ALUMINUM CONCENTRATION IN BREAST TUMORS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde, área de concentração em oncologia ginecológica e mamária.

Doctorate Thesis presented to the Tocogynecology Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Health Sciences, specialization in breast and gynecologic oncology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA RAQUEL MARY RODRIGUES PERES E ORIENTADA PELO Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

Assinatura do Orientador

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

P437i	Peres, Raquel Mary Rodrigues, 1983- Instabilidade genômica em neoplasias malignas da mama em função da concentração de alumínio intracelular / Raquel Mary Rodrigues Peres Campinas, SP : [s.n.], 2013.
	Orientador : Luis Otavio Zanatta Sarian. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	 Neoplasias da mama. Alumínio. Gene erbB-2. Gene c-myc. Ciclina D1. Sarian, Luis Otávio Zanatta, 1974 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Genomic instability association with intracellular aluminum concentration in breast tumors.

Palavras-chave em inglês:

Г

Breast neoplasms Aluminum ErbB-2 gene C-myc gene Cyclin D1

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luis Otávio Zanatta Sarian [Orientador] Lúcia Helena Simões da Costa Paiva Luiz Carlos Zeferino Ana Elizabete Silva Jurandyr Moreira de Andrade

Data da defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

Orientador: Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

Membros:	
1. Luis Otávio Zanatta Sarian	Mmi
2. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva	augest
3. Luiz Carlos Zeferino	del
4. Ana Elizabete Silva	Ana Esiba
5. Jurandyr Moreira de Andrade	Furchady

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30/07/2013

Dedico este trabalho...

Aos meus sobrinhos Beatriz e Leonardo,

para que saibam que o conhecimento produz a esperança.

Agradecimentos

A Deus, pelo sustento e sabedoria, por ter me criado com persistência e força para ir até o fim, além de ter utilizado todo esse tempo para trabalhar em mim de forma que hoje eu me alegre em ser alguém melhor do que fui, mesmo sabendo que o melhor ainda está por vir.

Ao meu marido Daniel, por sua presença, compreensão e pelo compartilhar durante todo o caminho.

A todos - família e amigos - que estiveram presentes durante o tempo de realização deste trabalho, sempre fontes de alegria e ânimo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Otávio Z. Sarian, pela sempre pronta disposição em orientar e suplantar os desafios.

À Dra. Juliana K. Heinrich Muçouçah, supervisora dos Laboratórios Clínicos Especializados (LCE) do CAISM/UNICAMP, pelos conhecimentos trocados, pela amizade de todos esses anos e por ter sido exemplo para mim na profissão e na vida.

Aos funcionários dos Laboratórios Clínicos Especializados (LCE) do CAISM/UNICAMP: Cássia, Lúcia, Lucilene, Mara, Alex, Fernando e Renata, pela convivência, amizade e grande ajuda durante toda a realização deste trabalho.

۷

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Espectrometria de Absorção Atômica da área de Química Analítica do Instituto de Química (IQ/UNICAMP), em especial à Profa. Dra. Solange Cadore e à Stefanny Febraio, pela imensa colaboração na realização da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite e análise das amostras e pela orientação e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Citogenética do Câncer da Universidade do Colorado em Denver/EUA, em especial à Profa. Dra. Marileila Varella Garcia e às biologistas Margaret Skokan e Sujatha Gajapathy, pelo treinamento técnico para produção das sondas para FISH.

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain e à Kátia Píton Serra, do Departamento de Oncologia do CAISM/UNICAMP, pela colaboração na coleta das amostras para este trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP e do Laboratório de Patologia Molecular do CIPED, em especial à Dra. Glauce Aparecida Pinto, ao Prof. Dr. José Vassallo e ao biólogo Paulo Latuf Filho, pela colaboração na seleção e emblocamento das amostras.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Centro de Pesquisas do Hospital do Câncer - AC Camargo (SP), em especial ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e Dra. Isabela Werneck da Cunha, pela realização da técnica de TMA.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva (CAISM/UNICAMP), Profa. Dra. Ana Elizabete Silva (UNESP São José do Rio Preto), Profa. Dra. Suzana Guimarães Moraes (PUC-SP e Faculdade de Medicina de Jundiaí), Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel (CAISM/UNICAMP) Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino (CAISM/UNICAMP), Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade (USP Ribeirão Preto) e ao Prof. Dr. Cássio Cardoso Filho (CAISM/UNICAMP) pela participação na banca examinadora deste trabalho e pela imensa contribuição dispensada.

À Profa. Dra. Júlia Yoriko Shinzato (CAISM/UNICAMP), à Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel (CAISM/UNICAMP) e ao Prof. Dr. Cássio Cardoso Filho (CAISM/UNICAMP) pela participação na banca de qualificação deste trabalho, tendo muito contribuído para o seu aprimoramento.

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia – FCM/UNICAMP, Denise, e às secretárias do Departamento de Oncologia do CAISM/UNICAMP, Neusa e Débora, pela pronta ajuda sempre quando necessária.

À FAPESP, pelo financiamento deste projeto e pela concessão da bolsa de doutorado.

Este estudo foi financiado:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), financiamento através do auxílio-pesquisa e bolsa de doutorado – FAPESP 2008/02469-8 e 2009/06148-4: "Instabilidade genômica em neoplasias malignas da mama em função da presença do receptor de estrogênio e da concentração de alumínio intracelular".

"Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários."

C. S. Lewis

Sumário

Síı	nbolos, Siglas e Abreviaturas	xi
Re	sumo	xii
Su	mmary	xiv
1.	Introdução	16
2.	Objetivos	26
	2.1. Objetivo Geral	26
	2.2. Objetivos Específicos	26
3.	Publicações	27
	3.1. Artigo 1	28
	3.2. Artigo 2	52
4.	Discussão	75
5.	Conclusões	82
6.	Referências Bibliográficas	83
7.	Anexos	89
	7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados	89
	7.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	91
	7.3. Anexo 3 – Normas para armazenamento de material biológico humano no âmbito de projeto de pesquisa	93
	7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação do projeto no CEP - FCM/UNICAMP	94
	7.5. Anexo 5 – Protocolo de produção de sondas para FISH	96

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- **CAISM** Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti –Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
 - **DNA** Ácido Desoxirribonucleico
 - ERE Elemento de Resposta ao Estrogênio
 - **FDA** Food and Drug Administration
 - FISH Hibridização in situ por Fluorescência
- **GFAAS** Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
 - INCA Instituto Nacional do Câncer
- **mRNA** Ácido ribonucleico mensageiro
 - **NAF** Nipple Aspirate Fluid
 - **TFs** Fatores de Transcrição
 - TMA Tissue Microarray
- **UNICAMP** Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Introdução: A hipótese de que os efeitos do alumínio em células humanas podem ter implicações clínicas tem sido levantada há algum tempo, especialmente no que concerne ao câncer de mama. As evidências laboratoriais mostrando altos níveis de alumínio nos tecidos da mama e os efeitos biológicos conhecidos sobre esse metal não são suficientes para estabelecer uma relação causal entre a exposição ao alumínio e o risco aumentando para o desenvolvimento do câncer de mama. O objetivo deste estudo foi estabelecer a concentração de alumínio nas áreas centrais e periféricas de tumores de mama, assim como na área glandular normal da mama e correlacionar esses achados com a instabilidade dos genes ERBB2, C-MYC e CCND1 e a aneuploidia dos cromossomos que contêm estes genes. Métodos: Para este estudo foram incluídas 176 mulheres com diagnóstico de carcinoma invasor de mama, com tumores maiores de 1cm³, sem quimioterapia neoadjuvante, operadas enter 2008 e 2010 no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) -UNICAMP. Para a análise da concentração de alumínio intracelular, amostras de 150 pacientes foram consideradas viáveis; para a análise da instabilidade genômica em função da concentração de alumínio, 118 amostras foram

consideradas viáveis, definindo o espaço amostral de cada um dos artigos apresentados. As amostras das áreas centrais e periféricas dos tumores de mama e das áreas glandulares normais da mama foram obtidas. A guantificação do alumínio contido nos tecidos da mama foi feita através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS). Uma lâmina de Tissue Microarray (TMA), contendo as amostras de tumor e tecido normal foi utilizada para a realização da técnica de FISH para acessar o status dos genes ERBB2, C-MYC e CCND1 e dos centrômeros dos seus respectivos cromossomos 17, 8 e 11. Os dados clínico-patológicos foram obtidos dos prontuários de pacientes. Resultados: A média da concentração de alumínio encontrada na mama foi de 1,88 mg/kg nas áreas centrais do tumor, 2,10mg/kg nas áreas periféricas do tumor e 1,68mg/kg nas áreas de tecido glandular normal. A amplificação e/ou aneuploidia para ERBB2/CEP17, C-MYC/CEP8 e CCND1/CEP11 foi encontrada em 24%, 36,7% e 29,3% dos tumores, respectivamente. A média da concentração de alumínio nas áreas tumorais (tanto centrais quanto periféricas) não foi significativamente diferente daquela nas áreas de tecido normal. A concentração de alumínio também não foi significativamente associada a nenhum status de amplificação e/ou aneuploidia para os genes/cromossomos em questão. **Conclusões:** Consideramos importante que estudos experimentais in vitro continuem sendo realizados para elucidar os possíveis efeitos do alumínio nos tumores de mama, quer sejam esses efeitos relacionados ao microambiente tecidual ou mesmo a outras vias de estabilidade genômica.

Palavras-chave: câncer, mama, alumínio, ERBB2, C-MYC, CCND1.

Summary

Introduction: It has long been hypothesized if the effects of aluminum on human cells may have clinical implications, especially regarding to breast cancer. The current laboratorial evidence showing higher levels of aluminum in breast tissues and the known biological effects of this metal, are not sufficient to establish a causal relationship between aluminum exposure and increased risk of developing breast cancer. The objective of this study was to establish the aluminum concentration in the central and peripheral areas of breast tumors as well as in normal glandular area of the breast and to correlate these findings with the instability of ERBB2, C-MYC and CCND1, and aneuploidy of chromosomes harboring these genes. Methods: This study included 176 women diagnosed with invasive breast carcinoma with tumors larger than 1cm³ without neoadjuvant chemotherapy, operated between 2008 and 2010 at the Women's Hospital Professor. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) - UNICAMP. To analyze the intracellular concentration of aluminum, samples from 150 patients were considered viable; for the analysis of genomic instability as a function of the concentration of aluminum, 118 samples were considered viable. These figures define the sample of each of the two

articles that this PhD thesis comprises. Evaluation of tissue aluminum content was carried out using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS). A TMA slide containing the tumor and normal samples was used in FISH assays to assess ERBB2, C-MYC and CCND1 and the respective chromosomes 17, 8 and 11 centromeres status. Clinicopathological data were obtained from patients' records. Results: The average aluminum content found in breast was 1.88 mg/kg in the central tumor areas, 2.10 mg/ kg in the peripheral tumor areas and 1.68 mg/ kg in the normal tissue areas. The amplification and/or aneuploid status for the ERBB2/CEP17, C-MYC/CEP8 and CCND1/CEP11 was detected in 24%, 36.7% and 29.3% of the tumors, respectively. The average aluminum content in tumor areas (either central or peripheral) was not significantly different from that in normal tissues. We found that aluminum concentration was not related to any of the gene status. **Conclusions:** We consider important that *in vitro* experimental studies continue to be done in order to elucidate the possible effects of aluminum in the development of breast tumors, whether it is influencing the tissue microenvironment or other genome stability pathways.

Keywords: cancer, breast, aluminum, ERBB2, C-MYC, CCND1.

1. Introdução

As neoplasias de mama são o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo (1). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam o câncer de mama como sendo o segundo mais comum na população, com 52.680 casos estimados para 2012, e consequente risco de 52 casos a cada 100.000 mulheres. Além disso, é a principal neoplasia responsável por óbitos entre mulheres brasileiras no período pós-menopausa (2).

O câncer de mama está associado a vários fatores comportamentais e biológicos, e a hereditariedade pode ser relevante em parte expressiva dos casos, com a estimativa de que 5% a 10% dos tumores de mama sejam causados por herança de mutações germinativas, como as encontradas nos genes *BRCA-1* e *BRCA-2* (3).

No entanto, vários outros genes quando mutados podem contribuir, isoladamente ou em conjunto, para a tumorigênese, progressão da doença, resposta ao tratamento e na metastatização e recidiva dos casos, como os de *ERBB2* (ou *HER-2*), *INT2*, *C-RAS*, *C-MYC*, *NM23*, *TP53*, *RB*, *CCND1*, *EGFR* (ou *ERBB1*). Estes são apenas alguns genes relacionados ou possivelmente relacionados ao aparecimento de neoplasias na mama e são classificados nas categorias de proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, dependendo de sua forma de expressão.

A ativação de oncogenes na célula proporciona um ganho de função ou uma superexpressão dos produtos codificados pelo gene, causado por sua amplificação, como é o caso de *ERBB2*, *CCND1* e *C-MYC*, entre outros de menor relevância. Esses oncogenes levam à inibição da apoptose e a mecanismos de proliferação celular intensa e ininterrupta. Já os genes supressores tumorais só levam ao processo de tumorigênese quando estão inativos ou perdidos em ambos os alelos, pois são eles que inibem ou previnem a expressão do fenótipo maligno do tumor, quando íntegros. Portanto, quando perdem sua função, permitem que a célula se multiplique inadvertidamente, levando ao processo de formação do tumor (4,5).

Gene	Cromossomo	Função	Achados
ERBB2	17	Codifica a proteína transmembrana tirosina-quinase, superexpressa quando há amplificação do gene	Amplificação em 15% a 20% nos cânceres de mama; proteína-alvo do tratamento com <i>Herceptin</i>
C-MYC	8	Codifica uma proteína dupla- hélice/zíper leucina	Amplificação em 8% a 37% dos cânceres de mama; relacionados com maior agressividade do tumor
CCND1	11	Codifica uma proteína receptora nuclear que regula os ciclos celulares, especialmente na fase G1/S	Amplificação em 10% a 27% dos cânceres de mama; envolvidos na carcinogênese

Tabela 1. Descrição dos genes de interesse para o presente estudo (6,7)

Sabe-se que a formação do tumor ocorre a partir de uma ou mais mutações no genoma de uma célula. Dessa forma, há maior chance de desenvolvimento de novas anormalidades genéticas nessa célula. Translocações, perda de material cromossômico, amplificações, duplicações ou inversões, substituições de pares de base podem ocorrer quando a célula não consegue utilizar seu sistema de reparos adequadamente. Essas aberrações são chamadas de *Instabilidade Genômica*, e resultam na produção exacerbada ou falta de proteínas, tanto normais quanto alteradas, levando a célula aos processos de tumorigênese e progressão, metastatização e recidiva, podendo influenciar no tratamento.

Uma das formas de se estudar essa instabilidade genômica é verificar a aneussomia nos tecidos tumorais. A aneussomia é a variação no número de cópias de um ou mais cromossomos dentro de um lote normal de cromossomos em uma célula. Tsukamoto et al. (8) demonstraram que, para o câncer de mama, os cromossomos 1, 11 e 17 apresentam uma alta frequência de aneussomia, sendo que o aumento do número de cópias desses cromossomos está correlacionado significativamente com metástases nos linfonodos, o que pode ser um novo marcador de agressividade para esse tipo de câncer.

As aberrações cromossômicas em células tumorais podem ser identificadas por meio de técnicas citogenéticas convencionais e moleculares, que detectam alterações no cariótipo de tais células. O bandamento G é uma das técnicas mais utilizadas, permitindo a visualização de quebras, rearranjos e identificação de aneuploidias. No entanto, algumas limitações quanto à identificação de rearranjos complexos são um problema das técnicas de citogenética convencional, sendo necessária, assim, a aplicação de técnicas moleculares mais sensíveis.

Uma dessas técnicas é a Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), que permite que uma sequência de DNA, chamada sonda, pareie diretamente com uma seguência homóloga a esta, o alvo do estudo. A sonda é marcada com um corante fluorescente, que será identificado por emissão de diferentes comprimentos de onda, ou seja, cores diferentes dependendo do fluorocromo utilizado. Essa técnica torna possível a localização de genes ou fragmentos de DNA pertencentes a uma dada região cromossômica, possibilitando a identificação de cromossomos com ou sem a necessidade de cultivo celular. Essas características tornam a técnica rápida, além de possibilitar o mapeamento de genes em pesquisa genômica, identificação de rearranjos simples ou complexos e trocas/quebras cromossômicas devido a agentes mutagênicos (9,10). A utilização desta técnica em cortes histológicos, especialmente em Tissue Microarrays (TMAs) é bastante eficaz, considerando sua rapidez e tornando a análise bastante específica, podendo demonstrar com exatidão o nível de instabilidade cromossômica encontrada nas células tumorais (11,12,13).

A instabilidade genômica nos tumores de mama é mais frequentemente verificada nos quadrantes laterais. Ellsworth et al. (14) demonstraram que há maior instabilidade genômica nestas regiões da mama (11,2% nos quadrantes laterais *versus* 5,5% nos mediais), e essa instabilidade é possivelmente responsável pelo aparecimento das neoplasias. Outros estudos mostram que aproximadamente 31% dos tumores de mama estão localizados nos quadrantes laterais superiores,

podendo estar relacionados à existência de tecido epitelial abundante nessa região (15). No entanto, apenas a presença de maior quantidade de tecido não é suficiente para se afirmar que há disposição para o processo de formação tumoral e, portanto, outros fatores causadores de instabilidade genômica devem ser investigados (14,16).

Alguns autores sugerem que essa relação possa estar influenciada, entre outras causas, pelo uso de antitranspirantes contendo sais de alumínio, como o cloridrato de alumínio, cloreto de alumínio ou complexos de alumínio-zircônio, os quais, comprovadamente, apresentam efeitos tóxicos ao organismo humano em determinadas quantidades e cumulativamente (15;17).

Algumas substâncias, aplicadas topicamente ou consumidas por via oral, podem conter componentes que mimetizam o estrogênio e agem de forma semelhante a esse hormônio, por vezes prejudicando a homeostase do organismo. Os sais de alumínio são considerados xeno-estrogênios ou metaloestrogênios, e interferem nas funções do estrogênio com seus receptores em células de câncer de mama, por meio das ligações com esses receptores e da expressão gênica regulada por esse hormônio.

Sabe-se da importância do estrogênio para o câncer de mama. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a exposição ao estrogênio durante toda a vida tem grande influência sobre o desenvolvimento e aumento do risco para câncer de mama, sendo que as terapias endócrinas têm como base a ação do estrogênio nesse tipo de câncer. Quando o estrogênio atinge seu receptor na célula, este se liga propriamente ao DNA para realizar a transcrição.

Assim, como o alumínio pode funcionar como um xeno-estrogênio, ele competiria com o hormônio pelo receptor, e ao se ligar, chegaria juntamente com o receptor ao núcleo da célula, podendo interferir diretamente nas cadeias de DNA, levando à instabilidade genômica (15) (Figura 1). Esse hormônio age com mais intensidade nas mulheres da adolescência à menopausa, mas na forma de xeno-estrogênio, contido em produtos como cosméticos, por exemplo, utilizados pela maioria das pessoas, têm um tempo maior de ação, o que pode levar a danos ainda não totalmente elucidados (18).





O Alumínio (Al) pode adentrar o organismo humano por inalação, ingestão ou atravessando a barreira dérmica. Nesse último caso, a pele oferece grande proteção contra fatores externos, desde que esteja íntegra. No caso dos antitranspirantes, na cultura Ocidental existe o costume da depilação com lâmina na região da axila, exatamente onde estas substâncias são aplicadas. O uso da lâmina pode produzir pequenos cortes ou abrasões, que se tornam vias de entrada para substâncias externas, como os compostos contendo alumínio (15). Além disso, um estudo demonstrou que ocorre absorção de alumínio contido em compostos como o cloridrato de alumínio mesmo pela pele íntegra, em pequena proporção na aplicação de dose única, mas o uso contínuo e prolongado de substâncias desse tipo poderia levar ao acúmulo de elementos como o alumínio nos tecidos humanos (19). O muco das vias respiratórias, bem como as secreções do sistema gastrintestinal, oferecem proteção à entrada de certas substâncias, como os metais, mas não se sabe se as doses a que o organismo está exposto é compatível com a eficiência da barreira oferecida por essas vias (20).

Vários autores têm levantado hipóteses quanto à utilização do alumínio, principalmente contido nos antitranspirantes, como um fator que poderia levar ao aparecimento do câncer de mama. Darbre (21) sugere que metais como o alumínio, cádmio, mercúrio, cobre, cobalto, entre outros, têm a capacidade de se ligar ao receptor de estrogênio da célula e mimetizar a função desse hormônio. Mesmo com suas estruturas diferentes e complexas, alguns desses metais puderam ser observados *in vitro* e *in vivo*, a maioria em células de linhagens tumorais, ligando-se a receptores de estrogênio e interferindo na expressão de genes ou

influenciando no crescimento e desenvolvimento de glândulas mamárias e na puberdade precoce, aumentando a altura uterina, e influenciando também na resposta androgênica (22,23,24).

Outras doenças foram relacionadas à presença ou acúmulo de alumínio em células humanas, como asma, fibrose cística, desordens do trato gastrintestinal, encefalopatias, alguns tipos de doença de Parkinson e mal de Alzheimer. Foram também descritas alterações conformacionais em peptídeos ao se ligarem ao alumínio, o que leva à perda de suas funções celulares 20,25,26). Estudos apontam para a acumulação do alumínio na cromatina do núcleo celular, podendo ligar-se ao DNA e ser genotóxico, além de estudos com animais terem associado o alumínio a efeitos carcinogênicos (27,28).

Karlik et al. (29) descreveram os efeitos do alumínio no DNA, demonstrando que ocorrem complexações entre os íons alumínio resultantes de alguns compostos e as hélices do DNA na cromatina, podendo girar ou dobrar essas duplashélices, mudando sua conformação e produzindo instabilidade. Dessa forma, há maior probabilidade de ocorrerem quebras, levando ao aparecimento de aberrações cromossômicas e consequente aumento da chance do aparecimento de tumores.

Um estudo retrospectivo considerando o uso de antitranspirantes contendo sais de alumínio e o hábito de depilação com lâmina em mulheres com câncer de mama foi realizado em Chigago, EUA. Quatrocentas e trinta e sete mulheres que desenvolveram câncer de mama foram avaliadas. O grupo das mulheres que começaram o uso dos antitranspirantes associado ao hábito de depilação com lâmina mais cedo e em maior quantidade foi o que teve o câncer de mama diagnosticado também mais cedo (17). Segundo regulamentação da *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) os antitranspirantes podem conter até 25% de princípios ativos em sua formulação, dependendo do composto de alumínio utilizado, para uma utilização segura por humanos (30). Os antitranspirantes contêm sais de alumínio desde o início de sua utilização, em 1903, e sua utilização por longos períodos não tem dados de bioavaliação, para garantir a segurança quanto ao uso contínuo (17).

Outro estudo, realizado por Mirick et al. (31), não encontrou relação entre o uso de antitranspirantes e o câncer de mama. Mulheres entre 20 e 74 anos foram entrevistadas quanto a seus hábitos de depilação e utilização de desodorantes e antitranspirantes separadamente, tendo como controles as mulheres sem o câncer de mama na mesma faixa etária, pareadas por grupos de idade em intervalos de cinco anos. O risco para câncer de mama não aumentou em comparação entre as usuárias de antitranspirantes que se depilavam com lâmina ou não, e o grupo-controle. Esse risco também não foi verificado em um estudo desenvolvido no Iraque, que comparava mulheres com câncer de mama que usam antitranspirantes e mulheres sem a doença que utilizam o mesmo produto. Foi encontrada maior porcentagem de usuárias de antitranspirantes entre o grupo-controle do que nas portadoras de tumores de mama, e outros fatores pareciam estar mais associados à doença, como o uso de contraceptivos orais e a história familiar (32).

No entanto, os estudos relacionando o alumínio e o câncer de mama ainda são muito controversos. Não há estudos *in vitro* mostrando que o alumínio pode ou não influenciar a formação ou desenvolvimento de tumores mamários, para que,

então, possam-se extrapolar os resultados para animais e humanos. Estudos abordando essa questão diferem muito em relação às técnicas utilizadas para detectar e quantificar os níveis de alumínio em tecidos humanos, a maioria utilizando técnicas indiretas de mensuração e avaliação das variáveis. Dessa forma, técnicas originalmente utilizadas para a detecção do alumínio em amostras não biológicas têm sido padronizadas para determinar de modo adequado os níveis de metais, como o próprio alumínio, em tecidos da mama, como é o caso da Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry), utilizada neste estudo (24,33,34). Um estudo utilizando essa técnica detectou níveis significativos de metais pesados no sangue e tecidos de mulheres que apresentavam lesões na mama quando comparados com tecidos de mulheres sadias (35). Assim, vê-se que os xeno-estrogênios, como o alumínio, estão presentes em diversas substâncias com as quais as pessoas têm contato no dia a dia (ex.: alimentos, cosméticos), mas ainda não se sabe ao certo seus efeitos no organismo humano e suas consequências em longo prazo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Determinar a instabilidade dos genes *C-MYC*, *ERBB2* e *CCND1* no tecido tumoral da mama e suas relações com a presença de alumínio intracelular.

2.2. Objetivos Específicos

- Artigo1: Comparar as concentrações de alumínio intracelular nas regiões centrais e periféricas de cânceres de mama e nas regiões de tecido mamário normal circunjacentes.
- Artigo 2: Determinar os estatus dos genes ERBB2, C-MYC e CCND1 e de seus respectivos cromossomos em função da concentração de alumínio intracelular em amostras de câncer de mama.

3. Publicações

Artigo 1 – Aluminum concentrations in central and peripheral areas of malignant breast lesions do not differ from those in normal breast tissues

Artigo 2 – Implications of tissue aluminum concentration on ERBB2, C-MYC and CCND1 gene status in breast cancer



3.1. Artigo 1

Aluminum concentrations in central and peripheral areas of malignant breast lesions do not differ from those in normal breast tissues

Authors:

Raquel Mary Rodrigues Peres¹, Biologist, Master Solange Cadore², Chemist, PhD Stefanny Febraio², Graduate student (Chemistry) Juliana Karina Heinrich¹, Biologist, PhD Katia Piton Serra¹, M.D., Master Sophie F. M. Derchain¹, M.D., PhD Jose Vassalo³, M.D, PhD Luis Otavio Sarian¹, M.D, PhD

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas ²Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry- University of Campinas, Campinas, SP, Brazil ³Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas

Address for correspondence:

Luis Otávio Sarian

Alexander Fleming, 848, Nova Campinas, Campinas, São Paulo – Brazil sarian@unicamp.br

Abstract

Background: Aluminum is used in a wide range of applications and a potential environmental hazard. The known genotoxic effects of aluminum might play a role in the development of breast cancer. However, the data currently available on the subject are not sufficient to establish a causal relationship between aluminum exposure and the augmented risk of developing breast cancer. To achieve maximum sensitivity and specificity in the determination of aluminum levels, we have developed a detection protocol using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The objective of the present study was to compare the aluminum levels in the central and peripheral areas of breast carcinomas with those in the adjacent normal breast tissues, and to identify patient and/or tumor characteristics associated with these aluminum levels. Methods: A total of 176 patients with breast cancer were included in the study. Samples from the central and peripheral areas of their tumors were obtained, as well as from the surrounding normal breast tissue. Aluminum quantification was performed using GFAAS. Results: The average (mean ± SD) aluminum concentrations were as follows: central area, $1.88 \pm 3.60 \text{ mg/kg}$; peripheral area, 2.10 ± 5.67 mg/kg; and normal area, 1.68 ± 11.1 mg/kg. Overall and two-by-two comparisons of the aluminum concentrations in these areas indicated no significant differences. We detected a positive relationship between aluminum levels in the peripheral areas of the tumors, age and menopausal status of the patients (P = .02). Conclusions: Using a sensitive quantification technique we detected similar aluminum concentrations in the central and peripheral regions of breast tumors, and in normal tissues. In addition, we did not detect significant differences in aluminum concentrations as related to the location of the breast tumor within the breast, or to other relevant tumor features such as stage, size and steroid receptor status. The next logical step is the assessment of whether the aluminum concentration is related to the key genomic abnormalities associated with breast carcinogenesis.

Key Words: Aluminum, Breast, Cancer, Atomic spectrometry, Biohazard

Background

The use of aluminum, in many different chemical presentations, has now reached the highest level in documented history. This element is one of the most common metals in the lithosphere, and it is utilized in a wide range of industries manufacturing products such as food, paper, dyes, pigments, paints, glass, fuels, textiles, cosmetics and pharmaceuticals; it is also used in water purification and oil refining processes. The presence of elevated concentrations of aluminum in the general public might be a consequence of its extensive use [1].

It has been hypothesized that powerful antiperspirants containing aluminum compounds, widely used in current formulations of hygiene products that are generally applied to the axilla, may pose some risks to health [2]. Recent evidence has indicated increased genomic instability in the outer guadrants of the breast [3], and in one report it was suggested that higher levels of aluminum may be present in this region (axilla and lateral) relative to the inner breast regions (medial and middle) [4]. Besides being associated with carcinogenic effects in animal studies, aluminum is known to bind to DNA and to be genotoxic. The metal also exhibits neuronal effects in humans, showing an influence on iron homeostasis, which might link aluminum chronic exposure with the development of Parkinson's and Alzheimer's diseases [5,6]. Also, a few types of metal such as aluminum, cadmium, mercury, copper, cobalt, among others, have the capacity to bind to the estrogen receptors in cells and mimic the function of this hormone, although other studies have refuted this idea [7-9]. Even though they have different and complex structures, some of these metals were described as having the ability to bind to estrogen receptors in the majority of tumor cell lines tested, both *in vitro* and *in vivo*; this mechanism might lead to altered protein expression, mammary gland development and precocious puberty, and can increase the height of the uterus and influence androgen response [7].

The current data regarding elevated levels of aluminum in some areas of the breast, and the known biological effects of this metal in breast tissues, are not sufficient to establish a causal relationship between aluminum exposure and the augmented risk of developing breast cancer. Studies addressing this issue differ in relation to the techniques used to detect and quantify the aluminum levels.

High specificity techniques, formerly used in non-biological experiments, have now been standardized for metal level determinations in biological samples [10-12]. Atomic Absorption Spectrometry (AAS) has been used to accurately determine the metal concentrations in human breast tissues [4]. In one study using this technique, significantly higher levels of a few heavy metals were detected in the blood and tissues of women with breast lesions relative to healthy controls [13].

We have developed an aluminum detection protocol, tailored for breast tissues, using graphite furnace-AAS (GFAAS) to achieve maximum sensitivity and specificity in the determination of aluminum levels. In the present study, we thus contrasted the aluminum levels of central and peripheral areas of breast carcinomas and the adjacent normal breast tissues in an unprecedentedly large set of patients. We also tried to identify patient and/or tumor characteristics that were possibly associated with aluminum levels.

Methods

Patients and sample collection

For this cross-sectional study, we recruited a total of 176 women who had consecutively undergone surgical (either radical or conservative) treatment for breast cancer at the Breast Cancer Clinics of the Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Inte gral à Saúde da Mulher(CAISM), at the State University of Campinas (UNICAMP), between 2008 and 2010. Immediately after the removal of the surgical specimen one of the researchers macroscopically assessed the specimen, identified and measured the tumor area. Next, if the tumor area had a great axis that was larger than 1.0 cm, the researcher sampled the central and the peripheral regions of the tumor with a scalpel, and divided each of the two samples into two mirror fragments. Also, a sample from a macroscopically normal glandular area of the breast was obtained, and the sample was divided into two mirrored fragments (Figure 1). One of the two fragments from the central and peripheral tumor areas, as well as from the normal glandular area, were stored at -196°C for further measurements of aluminum concentration, and the other fragment was fixed in formalin for subsequent embedding in paraffin. The fragment sent for paraffin embedment was processed and stained using H&E, and subsequently assessed by an experienced pathologist who determined the presence of invasive carcinomas in the sample. The mirror fragments of the selected specimens were sent for aluminum quantification. Twenty-six women had to be excluded from this study due to technical difficulties or the absence of invasive breast carcinoma in the collected fragment. Thus, 150 viable samples were obtained for the study. Clinicopathological data were obtained from patient records. The

study protocol was fully approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences - State University of Campinas (CEP #705/2007) and all patients signed informed consent forms.

Aluminum quantification using GFAAS

Evaluation of tissue aluminum content was carried out at the Chemistry Institute of the Campinas State University (IQ/UNICAMP). The previously frozen tissue samples (-196[°]C) from the central and peripheral areas of the tumors, and also from adjacent areas of normal tissue, were dried in Falcon tubes in a vacuum desiccator at low pressure for 60 h. These tubes were weighed before and after tissue drying, for estimation of the wet mass. After drying, the tubes containing the samples were weighed to determine the dry tissue mass. This enabled standardization of the amount of tissue used in each case, thus removing the interference from water content. All of the glassware used in the analysis was previously treated with 10% v/v concentrated HNO₃ and then washed three times with ultrapure water. Sample solubilization was carried out overnight using 25% (m/v) tetramethylammonium hydroxide (TMAH), in the proportion of 1 ml of reagent to 250 mg of wet sample [14]. After solubilization, the samples were diluted with an aqueous solution of 0.35% Triton-X 100 to a final volume corresponding to a dilution factor of 75 times; this was prepared with ultrapure water for stabilization of the fat/water system, and the samples were analyzed using GFAAS.

The measurements were carried out using the following: a GFAAS (AAnalyst model 600, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) with background correction based on the Zeeman effect; an automatic sampler (model AS-800, Perkin-
Elmer, Norwalk, CT, USA); and THGA graphite tubes with an integrated L'vov platform and transversal heating (Perkin-Elmer). An aluminum hollow cathode lamp (λ = 309.271 nm; I = 25 mA) was used, and the measurements were made in integrated absorbance units. The volumes of the sample and the chemical modifier, Mg(NO₃)₂, were 20 μ L and 5 μ L, respectively. External calibration standards of aluminum containing 1.3% TMAH solution (v/v), which comprised aluminum concentrations from 2-24 µg/kg, were used under the optimized instrumental conditions for the heating program shown in **Table 1**. The samples analyzed were fat-rich and this is undesirable in order to have quantitative recovery of aluminum during GFAAS measurements. In this case, an alkaline treatment with TMAH [14] allowed the complete solubilization of the samples. Additionally, the use of $(Mg(NO_3)_2)$ as chemical modifier for the GFAAS heating program showed to be mandatory to obtain guantitative recoveries of the analyte. The correlation coefficients (R) for aluminum concentration and the water content of the samples were: 0.23 for normal tissues; 0.26 for peripheral tumor areas, and 0.16 for peripheral tumor areas, showing that samples with increased water content (and therefore lower fat content) had slightly higher concentrations of aluminum (Table 1). Analytical curves with correlation coefficient values lower than 0.995 were not accepted. Samples were divided into five smaller groups for analysis; for each group two reagent blanks were prepared, ensuring that the contamination originating from reagents and from the laboratory environment was minimized. Aluminum measurements were displayed in mg/kg. All of the measurements were made in triplicate. Analytical curve plots and calculation of aluminum concentration were carried out using ORIGIN PRO 7.0 software. To verify the accuracy of the proposed method, experiments involving the addition and recovery of the analyte were conducted, showing values between 96 and 111%.

Statistical analysis

Data were stored in Excel[®] spreadsheets and analyzed using the R Environment for Statistical Computing [15]. Confidence levels were set at 95% (P < .05 was considered significant). As a first step, we tested whether aluminum concentrations in the three regions (central and peripheral tumor regions, and normal breast tissues) conformed to the assumption of normality using the Shapiro-Wilk test. Log-transformed (to base e) values were used, since the raw data showed marked skewness. Results are presented in the original scale. After ascertaining data compliance to normality, we used the pairwise t-test for the comparison of the aluminum concentration in the central, peripheral and normal areas of the tumors. Paired comparisons were used in the calculations regarding data from central, peripheral and normal tissue samples obtained from the same individual. Next, we assessed the relationship between the clinical and pathological features of the cases and the aluminum concentration in the central, peripheral and normal areas (Tables 3, 4 and 5). For these analyses, we first examined the distribution of the aluminum concentration in the whole set of samples, considering the tissue's dry and defatted mass. We compared the mean aluminum concentration in relation to the clinical and pathological features of the patients and tumors (age, body mass index, menopausal status, quadrant harboring the tumor, tumor size, disease stage, histological grade, estrogen/progesterone receptor and cerbb2 statuses) using a linear regression model, for which we used log-transformed (to base e) data. We next determined three aluminum concentration groups based on the approximate three-tiered percentile distribution of the data: negative (null aluminum readings); 0.05-2.0 mg/kg; and \geq 2.0 mg/kg. Finally, we tested whether the clinical and pathological features of the patients and tumors features were associated with the trend in aluminum concentration using the chi-squared proportion trend test.

Results

Table 2 shows the aluminum concentration per tumor region, taking into consideration the central and peripheral regions of the tumor and normal breast tissue. The average aluminum content was 1.88 mg/kg in the central areas, 2.10 mg/ kg in the peripheral areas and 1.68 mg/ kg in the normal areas. Overall and two-by-two comparisons of the aluminum concentrations in these areas disclosed no significant differences. The average aluminum content in tumor areas (either central or peripheral) was not significantly different from that in normal tissues.

The average aluminum concentration in each area was analyzed according to the key clinical features and pathological characteristics of the cases (**Tables 3, 4 and 5**). We detected a positive relationship between aluminum levels in the peripheral areas of the tumors, age and menopausal status of the patients (P = .02 in each case). We also detected a positive relationship between estrogen and progesterone receptor expression and aluminum levels in the normal tissues (p=0.009 and 0.04, respectively). The other comparisons did not

yield any significant results. Next, the aluminum content was categorized into three levels (negative, 0.05-2.0 mg/kg and > 2.0 mg/kg), respecting the three-tiered percentile distribution of aluminum concentration in the whole. No significant trends in patient or tumor characteristics were found as related to the aluminum concentrations.

Discussion

In our study, using a high-specificity technique, we detected similar aluminum concentrations in the central and peripheral regions of breast tumors. More interestingly, these concentrations did not depart from the aluminum levels found in the surrounding normal tissues. The results clearly suggest that there is no aluminum gradient from normal to diseased breast tissue. Our study also examined whether tumor location within the breast, among other variables, influenced the aluminum concentrations; results were negative.

The relationship between aluminum exposure and breast cancer has been hypothesized for a long time. However, there are technical challenges involved in measuring the metal content of human tissues. This is especially true of breast tissues which contain a high content of fat, which makes sample preparation difficult. Early studies used indirect measurements of the aluminum content of breast tissues, for example questionnaires addressing the use of antiperspirants containing aluminum [16,17]. More recent studies have used better performing direct measurement techniques [18,19]. Even minimal differences in aluminum concentration may be of biological significance, since *in vitro* studies regarding the effects of aluminum and other metals on the cell have demonstrated that even concentrations as low as 4 nmol/g may exert proestrogenic and possibly carcinogenic effects [4]. Our study was a specificity-driven attempt at quantifying the aluminum content of the human breast, and featured one of the larger sample sizes of diseased and normal breast tissues. Pasha et al. [19] compared malignant and benign breast lesions (normal breast tissue was not examined) in a set of 114 lesions, and found no difference in aluminum concentration between benign and malignant lesions. In another study [4], the aluminum content was measured in tissue samples from the axilla, lateral, middle and medial regions of the breast of 17 patients who underwent mastectomy due to breast cancer. These authors reported a significantly higher aluminum concentration in the outer (axilla plus lateral regions) relative to the inner (middle and medial regions) breast. By way of contrast, the aluminum concentration did not differ across breast quadrants in our study. However, it is worth mentioning that it was designed to evaluate differences in aluminum concentrations between central and peripheral areas of breast tumors, but not to assess the differences in aluminum concentrations across breast guadrants.

As compared with other studies, we detected lower aluminum concentrations in breast cancer tissues and normal breast samples. Differences related to sample collection and processing might have accounted for the different results. While a majority of studies have reported mean values of aluminum for both normal and cancerous tissues in the range 3.63-19.5 μ g/g [18,19,20], our results showed values of 1.68 μ g/g for normal breast specimens and 1.88-2.1 μ g/g for breast cancer specimens (when converted to the same unit of measurement). We detected a non-significant trend in aluminum concentration from the inner core of the tumors to the peripheral areas. Speculatively, this trend may be attributable to the preferential accumulation of aluminum due to the biochemistry of tumorous tissues, as previously hypothesized by Mannello [21]. It is also sensible to infer that the outer regions of the tumor may concentrate higher quantities of aluminum due to uptake by the immune system from the axillary skin.

We found a significant association between age and menopausal status with aluminum concentration in the peripheral regions of the tumors. This may be attributable to the time effect of continual usage of aluminum-based antiperspirants, or to other exposures. However, this finding has never been reported before for breast tissues, although other studies using nipple aspirate fluids from women with breast cancer have shown higher aluminum levels in post-menopausal subjects. Also, it has been suggested that age might be related to aluminum accumulation over time [2,21,22].

Our study had a few possible technical shortcomings. Of particular concern is the possible interaction between aluminum and other trace elements, such as calcium. It is known that the calcium binding protein osteopontin forms stable complexes with aluminum. It has also been established that both malignant and nonmalignant breast lesions frequently present with microcalcifications, which may in turn also harbor significant amounts of calcium [21,23,24]. We did not control our aluminum measurements for calcium concentrations in the sample, or record the number of radiologically detectable microcalcifications in the breast lesions. It has also been demonstrated that aluminum influences the homeostasis of iron binding proteins, in the form of ferritin and transferrin [21].

In conclusion, our study clearly suggests that the aluminum content of breast tumors may not differ significantly from that of the surrounding normal areas of the breast. In addition, we did not detect significant differences in aluminum concentrations as related to the location of the breast tumor within the breast, or to other relevant tumor features such as stage and size. The next logical step is the assessment of whether or not the aluminum concentration is related to the key genomic abnormalities associated with breast carcinogenesis, which is currently ongoing in our research laboratories.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Raquel Mary Rodrigues and Stefanny Febraio conducted the experiments and prepared the manuscript, under the supervision of Luis Otavio Sarian and Solange Cadore. Juliana Heinrich gave technical advice and Katia Piton Serra provided clinical advice during manuscript preparation. Jose Vassalo contributed on pathological advice. Sophie Derchain revised the final text and provided clinical advice.

Acknowledgments

This study was funded by grants 2008/02469-8 and 2009/06148-4 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Ganrot PO (1986). Metabolism and possible health effects of aluminum. Environ Health Perspect 65:363-441.
- McGrath KG (2003). An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. Eur J Cancer Prev 12:479:85.
- Ellsworth DL, Ellsworth RE, Love B, Deyarmin B, Lubert SM, Mittal V, et al (2004). Outer Breast Quadrants Demonstrate Increased Levels of Genomic Instability. Ann Surg Oncol 11(9):861-8.
- Exley C, Charles LM, Barr L, Martin C, Polwart A, Darbre PD (2007).
 Aluminium in human breast tissue. J Inorg Biochem 101:1344-6.
- 5. Platt B, Fiddler G, Riedel G, Henderson Z (2001). Aluminium toxicity in the rat brain: histochemical and immunocytochemical evidence. Brain Res Bull 55(2):257-67.
- Lukiw WJ, Percy ME, Kruck TP (2005). Nanomolar aluminium induces proinflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. J Inorg Biochem 99:1895-8.
- Darbre PD (2006). Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. J Appl Toxicol 26:191-7.
- 8. McGrath KG (2009). Apocrine sweat gland obstruction by antiperspirants allowing transdermal absorption of cutaneous generated hormones and pheromones as a link to the observed incidence rates of breast and prostate cancer in the 20th century. Med Hypothesis 72: 665-74.

- Namer M, Luporsi E, Gligorov J, Lokiec F, Spielmann M (2008). L'utilisation de déodorants/antitranspirants ne constitue pas un risque de cancer du sein. Bull Cancer 95(9):871-80.
- Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH (2010). Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. Clin Chim Acta 411: 531–539.
- Carvalho ML, Magalhães T, Becker M, von Bohlen A (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. Spectrochimica Acta Part B 62:1004-11.
- 12. Millos J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendicho C (2008). Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwaveassisted digestion. Anal Chimica Acta 622: 77-84.
- 13. Siddiqui MKJ, Jyoti, Singh S, Mehrotra PK, Singh K, Sarangi R (2006). Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. Environ Int 32:630-7.
- Santos MC, Sousa RA, Cadore S, Nóbrega JA, Barnes R, Tatro M (2006).
 Sample Preparation in Alkaline Medium. *Spectr Acta, Part B* 61:465-495.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.
- Mirick DK, Davia S, Thomas DB (2002). Antiperspirant use and the risk of breast cancer. J Nat Cancer Inst 94 (20): 1578-80.

- 17. Fakri S; Al-Azzawi A; Al-Tawil N (2006). Antiperspirant use as a risk factor for breast cancer in Iraq. East Medit Health J 12 (3/4): 478-82.
- NG K-H, Bradley DA, Looi L-M (1997). Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. Br J Radiol 70:375-82.
- 19. Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH (2008). Comparative evaluation of trace metal distribution and correlation in human malignant and benign breast tissues. Biol Trace El Res 125:30-40.
- Romanowicz-Makowska H, Forma E, Bryś M, Krajewska WM, Smolarz B. Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer. Pol J Pathol 2011, 62(4):257-61.
- 21. Manello F, Tonti GA, Medda V, Simone P, Darbre PD (2011). Analysis of Aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. J Appl Toxicol 31:262-9.
- 22. Darbre PD (2005). Aluminium, antiperspirants and breast cancer. J Inorg Biochem 99:1912-19.
- 23. Rowatt E, Sorensen ES, Triffit J, Viess A, Williams RJP (1997). An Examination of the Binding of Aluminum to Protein and Mineral Components of Bone and Teeth. J Inorg Biochem 68(4): 235-8.
- 24. Baker R, Rogers KD, Shepherd N, Stone N (2010). New relationships between breast microcalcifications and cancer. Br J Cancer, 103: 1034-9.

Step	Temperature	Ramp Time	Hold time	Flow rate
	(°C)	(s)	(s)	(mL min ^{- 1})
Drying	110	1	30	250
Drying	130	15	30	250
Pyrolysis	1500	10	20	250
Atomization	2350	0	5	0
Cleaning	2450	1	3	250
Cooling	20	1	5	250

Table 1. Optimized heating program for GF AAS measurements

Note: correlation coefficients for Aluminum concentration and the water content of the samples were: 0.23 for normal tissues; 0.26 for peripheral tumor areas, and 0.16 for peripheral tumor areas, showing that samples with increased water content (and therefore lower fat content) had slightly higher concentrations of aluminum.

Table 2. Comparison of Aluminum concentration in central and peripheralregions of the tumors, and normal breast tissue

Aluminum concentration per tumor region (mg/kg)							
	Central	Peripheral	Normal				
Mean	1.88	2.10	1.68	p-value*			
Standard deviation	3.60	5.67	11.1	0.88			
	Cancer reg	ions grouped	Normal				
Mean	1	.99	1.68	p-value*			
Standard deviation	3	.46	11.1	0.74			
Two-by-two comparisons of the tumor regions	N	lean difference		p-value*			
Central-Peripheral		0.67		0.96			
Central-Normal			0.97				
Peripheral-Normal			0.87				

*Paired t-tests were used to evaluate the within-individual variations in Aluminum concentrations. Log-transformed (to base e) data were used (see statistics section) in order to conform to normality.

	Aluminum content in mg/Kg					1					
Characteristics	Total	Меа	an (sd)	P**	Neg	jative*	0.05	5 – 2.0	00	≥2	P trend***
					n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Age <40 ≥40	20 130	1.25 1.97	(1.49) (3.81)	0.12	6 28	(17.6) (82.4)	9 72	(11.1) (88.9)	5 30	(14.3) (85.7)	0.68
<i>BMI</i> <25 ≥25	46 79	1.96 2.05	(2.43) (4.39)	0.74	7 18	(28) (72)	26 42	(38.2) (61.8)	13 19	(40.6) (59.4)	0.34
<i>Menopausal status</i> Post Pre	42 89	1.28 2.34	(1.32) (4.40)	0.03	9 18	(33.3) (66.7)	23 47	(32.9) (67.1)	10 24	(29.4) (70.6)	0.73
<i>Quadrant</i> Upper external Other	92 58	1.83 1.94	(3.61) (3.61)	0.93	23 11	(67.6) (32.4)	47 34	(58) (42)	22 13	(62.9) (37.1)	0.69
<i>Tumor size</i> <2.0cm <u>></u> 2.0cm	72 76	2.36 1.44	(4.64) (2.21)	0.21	13 21	(38.2) (61.8)	39 40	(49.4) (50.6)	20 15	(57.1) (42.9)	0.11
Stage I-II III – IV	90 58	2.19 1.42	(4.37) (1.90)	0.13	19 14	(57.6) (42.4)	49 31	(61.3) (38.8)	22 13	(62.9) (37.1)	0.65
Histologic grade I-II III	26 113	2.36 1.74	(6.02) (2.87)	0.79	5 27	(15.6) (84.4)	17 57	(23) (77)	4 29	(12.1) (87.9)	0.70
<i>Estrogen receptor</i> Negative Positive	40 103	1.34 2.13	(1.48) (4.22)	0.67	12 21	(36.4) (63.6)	17 59	(22.4) (77.6)	11 23	(32.4) (67.6)	0.72
<i>Progesterone receptor</i> Negative Positive	56 86	1.34 2.25	(1.31) (4.59)	0.86	15 18	(45.5) (54.5)	28 48	(36.8) (63.2)	13 20	(39.4) (60.6)	0.61
<i>cerbb2 status</i> Negative Positive	94 46	1.91 1.91	(3.54) (4.07)	0.18	22 11	(66.7) (33.3)	47 27	(63.5) (36.5)	25 8	(75.8) (24.2)	0.43

 Table 3. Aluminum content in central areas of the tumor according to the clinical

characteristics of the women and the pathological features of the tumors

Note: The aluminum concentration was categorized as negative, 0.05-2.0mg/kg and \geq 2.0mg/kg according to the three-tiered percentile distribution of the raw data. *Aluminum detection threshold for the GF-AAS was set at 0.05mg/kg; ** In this column, the p values refer to the comparison of the mean Aluminum concentrations in each strata, using independent samples t-tests with the log-transformed (to base e) data; ***In this column, the p-values refer to the Chi-squares for trends; i.e. if p<0.05, there is a significant trend in Aluminum concentration related to the specified characteristic (see statistics for more details).

			Aluminum content in ma/Ka					1			
Characteristics	Total	Mea	an (sd)	P**	Neg	ative*	0.05	– 2.0		≥ 2	P trend***
					n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Age											
<40	20	1.71	(1.79)	0.02	4	(16)	9	(10)	7	(20)	0.52
<u>></u> 40	130	1.97	(3.81)		21	(84)	81	(90)	28	(80)	
BMI											
<25	46	2.13	(1.06)	0.87	5	(31.2)	28	(36.8)	13	(39.4)	0.59
≥25	79	2.34	(1.93)		11	(68.8)	48	(63.2)	20	(60.6)	
Menopausal status											
Post	42	2.09	(2.33)	0.02	6	(35.3)	22	(27.8)	14	(40)	0.49
Pre	89	2.47	(1.15)		11	(64.7)	57	(72.2)	21	(60)	
Quadrant											
Upper external	92	1.96	(3.57)	0.86	14	(56)	56	(62.2)	22	(62.9)	0.61
Other	58	2.33	(1.97)		11	(44)	34	(37.8)	13	(37.1)	
Tumor size											
<2.0cm	72	2.31	(7.23)	0.81	12	(48)	40	(44.9)	20	(58.8)	0.34
<u>></u> 2.0cm	76	1.92	(3.77)		13	(52)	49	(55.1)	14	(41.2)	
Stage											
I-II	90	1.76	(3.23)	0.48	13	(52)	56	(63.6)	21	(60)	0.61
III – IV	58	2.67	(2.19)		12	(48)	32	(36.4)	14	(40)	
Histologic grade											
I-II	26	1.28	(1.17)	0.83	5	(21.7)	16	(19.3)	5	(15.2)	0.52
III	113	2.40	(2.48)		18	(78.3)	67	(80.7)	28	(84.8)	
Estrogen receptor											
Negative	40	1.77	(1.57)	0.19	5	(21.7)	22	(25.6)	13	(38.2)	0.14
Positive	103	2.32	(2.76)		18	(78.3)	64	(74.4)	21	(61.8)	
Progesterone receptor											
Negative	56	1.94	(2.56)	0.15	7	(30.4)	32	(37.6)	17	(50)	0.12
Positive	86	2.31	(7.20)		16	(69.6)	53	(62.4)	17	(50)	
cerbb2 status											
Negative	94	1.91	(3.54)	0.09	17	(73.9)	52	(62.7)	25	(73.5)	0.86
Positive	46	1.91	(4.07)		6	(26.1)	31	(37.3)	9	(26.5)	

Table 4. Aluminum content in peripheral areas of the tumor according to the clinical characteristics of the women and the pathological features of the tumors

Note: The aluminum concentration was categorized as negative, 0.05-2.0 mg/kg and ≥ 2.0 mg/kg according to the three-tiered percentile distribution of the raw data. *Aluminum detection threshold for the GF-AAS was set at 0.05 mg/kg; ** In this column, the p values refer to the comparison of the mean Aluminum concentrations in each strata, using independent samples t-tests with the log-transformed (to base e) data; ***In this column, the p-values refer to the Chi-squares for trends; i.e. if p<0.05, there is a significant trend in Aluminum concentration related to the specified characteristic (see statistics for more details).

Oh ann a fa riadia a	Alun					Alumi	ninum content in mg/Kg				
Characteristics	iotai	Mea	an (sd)	P	neg	jative^ (%)	0.0: n	0 – 2.0 (%)	n	≥2 (%)	P trend***
Age <40	20	1.13	(1.59)	0.17	3	(14.3)	15	(12.8)	2	(16.7)	0.91
<u>240</u> BMI <25 ≥25	46 79	3.68 0.78	(11.90) (19.9) (1.13)	0.38	5 10	(85.7) (33.3) (66.7)	36 65	(87.2) (35.6) (64.4)	5 4	(83.3) (55.6) (44.4)	0.40
<i>Menopausal status</i> Post Pre	42 89	4.06 0.73	(20.88) (0.98)	0.12	6 11	(35.3) (64.7)	33 71	(31.7) (68.3)	3 7	(30) (70)	0.75
<i>Quadrant</i> Upper external Other	92 58	2.19 0.87	(14.13) (1.32)	0.59	15 6	(71.4) (28.6)	70 47	(59.8) (40.2)	7 5	(58.3) (41.7)	0.37
<i>Tumor size</i> <2.0cm <u>></u> 2.0cm	72 76	0.78 2.56	(0.94)) (15.56)	0.28	6 14	(30) (70)	60 56	(51.7) (48.3)	6 6	(50) (50)	0.16
Stage I-II III – IV	90 58	2.19 0.92	(14.28) (1.51)	0.42	10 10	(50) (50)	74 42	(63.8) (36.2)	6 6	(50) (50)	0.75
Histologic grade - 	26 113	0.89 1.89	(1.30) (12.75)	0.53	4 15	(21.1) (78.9)	20 90	(18.2) (81.8)	2 8	(20) (80)	0.88
Estrogen receptor Negative	40	0.56	(0.49)	0.00	2	(10)	37	(33.3)	1	(8.3)	0.62
Positive	103	2.18	(13.37)	5	18	(90)	74	(66.7)	11	(91.7)	
Progesterone receptor Negative Positive	56 86	0.63 2.46	(0.68) (14.62)	0.04	4 16	(20) (80)	49 61	(44.5) (55.5)	3 9	(25) (75)	0.43
<i>cerbb2 status</i> Negative Positive	94 46	0.82 3.68	(1.19) (19.96)	0.77	13 6	(68.4) (31.6)	74 35	(67.9) (32.1)	7 5	(58.3) (41.7)	0.61

Table 5. Aluminum content in normal areas of the breast according to the clinical

characteristics of the women and the pathological features of the surrounding tumors

Note: The aluminum concentration was categorized as negative, 0.05-2.0 mg/ kg and $\geq 2.0 \text{ mg/ kg}$ according to the three-tiered percentile distribution of the raw data. *Aluminum detection threshold for the GF-AAS was set at 0.05 mg/kg; ** In this column, the p values refer to the comparison of the mean Aluminum concentrations in each strata, using independent samples t-tests with the log-transformed (to base e) data; ***In this column, the p-values refer to the Chi-squares for trends; i.e. if p<0.05, there is a significant trend in Aluminum concentration related to the specified characteristic (see statistics for more details).



Figure 1. Diagram showing the locations of the tissue samples obtained from each subject. Surgical specimens and lesion dimensions vary from subject to subject. *Resection margins apply to conservative surgeries (quadrantectomies). For patients treated with radical mastectomy, the resection margins are the boundaries of the resected organ.

3.2. Artigo 2

Date:	May 27, 2013					
To:	"Luis Otávio Sarian" luis.sarian@gmail.com					
From:	"Biological Trace Element Research" chessa.manongsong@springer.com					
Subject: Acknowledgement of Receipt						
Dear Dr. Sa	rian,					
We have reastability of E Biological Tr	ceived your manuscript entitled "Tissue aluminum concentration does not affect the genomic RBB2, C-MYC and CCND1 genes in breast cancer" for possible publication in our journal, race Element Research. A referee report will be sent to you as soon as it becomes available.					
During the r web site:	eview process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following					
http://b	ter.edmgr.com/					
Your userna Your passwo	me is: ******** ord is: *******					
Sincerely,						
Dr. Manuel Managing E Biological T	Flores-Arce ditor Trace Element Research					

Tissue aluminum concentration does not affect the genomic stability of *ERBB2*, *C-MYC* and *CCND1* genes in breast cancer

Authors:

Raquel Mary Rodrigues Peres¹, Solange Cadore², Stefanny Febraio², Juliana Karina Heinrich¹, Katia Piton Serra¹, Sophie F. M. Derchain¹, José Vassallo³, Luis Otavio Sarian¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil ²Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, State University of Campinas, São Paulo, Brazil ³Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Address for correspondence:

Luis Otávio Sarian

Alexander Fleming, 848, Nova Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Phone/Fax (+55 19) 3521-9305

luis.sarian@gmail.com

Summary

Introduction: It has long been hypothesized that body tissue uptake of aluminum may have biological or clinical implications in breast cancer. In vitro and in vivo studies have shown that aluminum may trigger genomic instability by directly interfering with DNA strands. **Objective:** To examine the relationship between aluminum concentration in peripheral and central areas of breast tumors with the instability of three key genes in breast cancer, ERBB2, C-MYC and CCND1, and aneuploidy of the chromosomes harboring these genes. Subjects and Methods: 118 samples of fresh breast cancer tissue were obtained. Evaluation of tissue aluminum content was carried out using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. A tissue microarray slide containing these samples was used in FISH assays to assess ERBB2, C-MYC and CCND1 expression as well as the centromere statuses of their respective chromosomes 17, 8 and 11. Clinicopathological data were obtained from patient's records. Results: Levels of aluminum >2.0 mg/kg were found in 20.3% and 22.1% of the central and peripheral breast tumor areas, respectively. Amplification and/or aneuploid positive statuses for ERBB2/CEP17, C-MYC/CEP8 and CCND1/CEP11 were detected in 24%, 36.7% and 29.3% of the tumors, respectively. We found that aluminum concentration was not related to any of these altered gene statuses. Conclusions: Our findings suggest that aluminum concentration does not directly affect genomic stability in breast tissues. Tissue microenvironment modifications, due to the presence of aluminum compounds, seem more appealing as a possible target for current and future studies to determine the implications of aluminum in breast carcinogenesis.

Key Words: Breast Cancer, Aluminum, Gene Amplification, Aneuploidy, GFAAS, FISH.

Introduction

Laboratory-derived evidence suggests that a group of heavy metals, including aluminum, cadmium, mercury, copper, cobalt, and lead, have the ability to bind the estrogen receptor. *In vitro* and *in vivo* studies, mostly using cell lines and animals, show that aluminum might bind estrogen receptors and interfere with gene expression or influence the growth and development of mammary glands. Other studies have also suggested an association between exposure to aluminum with earlier onset of puberty and early increase in uterine height^{1.2.3}. However, the function of these so-called *xenoestrogens*, such as aluminum, may not be identical to natural or synthetic estrogen. Instead, they may have implications in organismal homeostasis and also in triggering the process of genomic instability. Indeed, after binding the estrogen receptor, it has been hypothesized that aluminum may directly interfere in DNA strand which could lead to genomic instability^{4.5}.

It has long been hypothesized that the effects of aluminum on human cell lines may have clinical implications. This metal is widely used in the cosmetic and pharmaceutical industries, as well as in other potential documented and non-documented forms of human exposure^{1,3,4}. One potentially hazardous known form of exposure is the use of aluminum chloride, aluminum chlorohydrate and aluminum zirconium chlorohydrate glycine complexes, as powerful antiperspirants, in commercially available formulations of hygiene products generally applied to the axilla. Recent evidence suggests that higher levels of aluminum may be present in the outer quadrants of the breast of women who report the use of antiperspirants^{2,6}. However, the current laboratorybased evidence showing augmented levels of aluminum in some areas of the breast, and the known biological effects of this metal in breast tissues, are not sufficient to establish a causal relationship between aluminum exposure and augmented risk of developing breast cancer^{7,8}.

Techniques mostly used in non-biological experiments, have been standardized for metal concentration determination in biological samples^{9,10,11}. Among these, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) has long been used to accurately determine metal levels in human tissues. One study using this technique detected significantly higher levels of a few heavy metals in the blood and tissues of women with breast lesions compared with those in control women¹².

We recently examined the gradient of aluminum concentration from normal breast tissues to the peripheral and then to the central regions of invasive breast tumors using the GFAAS technique¹³, but we found no relationship between tissue location within the breast and the aluminum concentration in those regions. As an obvious next step, we decided to examine the relationship between aluminum concentration, detected using the GFAAS technique, and genome instability of three major genes implicated in breast pathology, *ERBB2, C-MYC* and *CCND1*, in a large number of breast cancer cases. These genes are known to be frequently amplified in breast carcinomas, in the order of approximately 20%, 30% and 15% for *ERBB2, C-MYC* and *CCND1*, respectively¹⁴. New information regarding the association of aluminum and genomic instability could eventually contribute to the clarification of the effects of aluminum accumulation in the body, either through ingestion, inhalation or by using substances containing aluminum compounds, for example, cosmetics and food.

Patients and methods

Patients and sample collection

For this cross-sectional study, we recruited a total of 176 women who had consecutively undergone surgical (either radical or conservative) treatment for breast cancer at the Breast Cancer Clinics of the Women's Hospital "Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti" - at the State University of Campinas (UNICAMP), between 2008 and 2010. Immediately after the removal of the surgical specimen it was macroscopically assessed, identified and the tumor area was measured. Next, if the tumor area had a great axis that was larger than 1.0 cm, samples of the central and peripheral regions of the tumor were taken with a scalpel. These were further subdivided into two mirrored fragments. A sample from a macroscopically normal glandular area of the breast was also obtained, and this was similarly divided into two mirrored fragments (Figure 1). One of the two fragments from the central and peripheral tumor areas, as well as one from the normal glandular area, was stored at -196°C until measurement of aluminum concentration. The remaining fragments were fixed in formalin for subsequent embedding in paraffin. The fragments sent for paraffin embedment were processed and stained using H&E, and subsequently assessed by an experienced pathologist who determined the presence of invasive carcinomas in the samples. The mirror fragments of the selected specimens were sent for aluminum quantification. Samples from fifty-eigth women were excluded from this study due to technical difficulties or the absence of invasive breast carcinoma in the collected fragment. Thus, 118 viable samples were obtained for the study. Clinicopathological data were obtained from patient records. The study protocol was fully approved by the institution's ethics review board (CEP #705/2007) and all patients signed informed consent forms.

Fluorescence in situ hybridization and probe production

Sequences corresponding to the *ERBB2*, *C-MYC* and *CCND1* genes were selected from the UCSC Genome Bioinformatics Site. BACs containing these sequences were ordered from Invitrogen[™]. After microbiological cloning and purification, the sequences were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and labeled by the Nick Translation technique (Nick Translation kit, Abbott Molecular Inc., Cat. #32-801300). Gene-specific probes were labeled in red (Red dUTP, Abbott Molecular Inc., Cat. #02N34-050) and were applied onto samples together with commercial probes for the corresponding chromosome centromere (CEN17, Kreatech Diagnostics, Cat. #SE17 D17Z1; CEN8, Kreatech Diagnostics, Cat. #SE8 D8Z2; CEN11, Kreatech Diagnostics, Cat. #SE11 D11Z1), labeled in green, as an internal control.

The *genes/centromeres* statuses were assessed by a single blinded observer. For each core in the tissue microarray (TMA) slide, 40 signals were observed during analysis and were evaluated as <2/2, 2/2 or >2/2, with regard to the aneuploidy status. Gene gain or loss was elucidated from these results which were used to categorize the samples as NORMAL, AMPLIFICATION, ANEUPLOIDY or AMPLIFICATION + ANEUPLOIDY^{15,16}. We then compared

those gene and chromosome statuses in tumors with aluminum concentrations of $\leq 2.0 \text{ mg/kg}$ or > 2.0 mg/kg in either the central or peripheral areas using chi-square analysis.

Aluminum quantification with GFAAS

Evaluation of tissue aluminum content was carried out at the Chemistry Institute of the Campinas State University (IQ/UNICAMP). The previously frozen tissue samples (-196°C) from the central and peripheral areas of the tumors, and also those from adjacent areas of normal tissue, were dried in Falcon tubes in a vacuum desiccator at low pressure for 60 h. The tubes were weighed before and after tissue drying, for estimation of the wet mass. After drying, the tubes containing the samples were weighed to determine the dry tissue mass. This enabled standardization of the amount of tissue used in each case, thus removing the interference from water content. All of the glassware used in the analysis was previously treated with 10% (v/v) concentrated HNO₃ and then washed three times with ultrapure water (18 M Ω cm, Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA). Sample solubilization was carried out overnight using 25% (m/v) tetramethylammonium hydroxide (TMAH, Sigma Aldrich, Germany), at a proportion of 1 ml of reagent to 250 mg of wet sample¹⁷. After solubilization, the samples were diluted with an aqueous solution of 0.35% Triton-X 100 (Sigma Aldrich, Germany) to a final volume corresponding to a dilution factor of 75 times; this was prepared with ultrapure water for stabilization of the fat/water system, and the samples were analyzed using GFAAS. The measurements were carried out using the following: a graphite furnace atomic absorption

spectrometer from Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA, model AAnalyst 600) with background correction based on the Zeeman effect: an automatic sampler (model AS-800, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA); and THGA graphite tubes with an integrated L'vov platform and transverse heating (Perkin-Elmer). An aluminum hollow cathode lamp ($\lambda = 309.271$ nm; I = 25 mA) was used, and the measurements were made in integrated absorbance units. The volumes of the sample and the chemical modifier, $Mg(NO_3)_2$, were 20 µL and 5 µL, respectively. External calibration standards of aluminum containing 1.3% TMAH solution (v/v), which comprised aluminum concentrations from 2–24 µg/kg, were used under the optimized instrumental conditions for the heating program shown in **Table 1**. Analytical curves with correlation coefficient values lower than 0.995 were excluded. Samples were divided into five smaller groups for analysis; for each group two reagent blanks were prepared, ensuring that the contamination originating from reagents and from the laboratory environment was minimized. Aluminum measurements were displayed in mg/kg. All of the measurements were made in triplicate. Analytical curve plots and calculation of aluminum concentration were carried out using ORIGIN PRO 7.0 software. To verify the accuracy of the proposed method, experiments involving the addition and recovery of the analyte were conducted, showing values between 96 and 111%.

Statistical analysis

All statistical calculations were performed using 5% confidence levels (p≤0.05). Data were stored in Microsoft Excel® spreadsheets and analyzed with

the R Environment for Statistical Computing, version 2.15.2¹⁸. We first examined the distribution of the aluminum concentration in the whole set of samples, with consideration for the tissues' dry and defatted masses. We next determined three aluminum concentration groups based on the approximate three-tiered percentile distribution of the data: negative (null aluminum readings); 0.05–2.0 mg/kg; and \geq 2.0 mg/kg. We compared the metal concentrations in peripheral and central areas of the tumors using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC) for agreement. Next, we compared the mean aluminum concentrations according to the *ERBB2, C-MYC* and *CCND1* gene statuses using the Kruskal-Wallis test, first in the central and next in the peripheral tumor areas.

Results

Table 2 depicts the key features of the 118 women included in the study and the main pathological characteristics of the tumors. Most women were 40 years old or above (85.6%), had two or more offspring (71.4%), and had their first pregnancy below 35 years of age (94.5%) and breastfed (76.9%). At the time of surgery, most women were postmenopausal (65.7%), but not receiving hormonal therapy (83.8%). Approximately 70% of the tumors expressed at least one steroid receptor (estrogen or progesterone). The *ERBB2, C-MYC* and *CCND1* genes were tested for amplification and ploidy. When the gene was amplified and/or its harboring chromosome aneuploid, it was classified as abnormal. An abnormal status for the *ERBB2, C-MYC* and *CCND1* genes was detected in 24%, 36.7% and 29.3% of the tumors, respectively. Trace aluminum (<2.0 mg/kg) was detected with the GFAAS in 26.3% and 15.2% of the central and peripheral tumor areas, respectively. By contrast, high levels (>2.0 mg/kg) of aluminum were found in 20.3% and 22.1% of the central and peripheral areas, respectively.

We next compared the aluminum concentrations in central and peripheral tumor regions. Coincident trace concentration of aluminum in both tumor areas were found in 13 tumors, whereas 14 other specimens showed >2.0 mg/kg of aluminum in both central and peripheral areas. The ICC of 0.41 is compatible with a fair agreement of aluminum concentrations in the tumor regions. Complete disagreement in aluminum measurements occurred for 7 cases (Table 3).

We also examined the *ERBB2*, *C-MYC* and *CCND1* gene statuses in relation to mean aluminum concentrations in either the central or peripheral tumor areas. Aluminum concentration was not related to any of the gene statuses in either tumor region (**Table 4**).

Discussion

We were unable to detect a positive relationship between the aluminum concentration in human breast carcinomas and genomic alterations in genes known to be strongly associated with breast cancer. Our study differs from previous research in the field, especially in relation to the sample size. Previously, there were no studies relating direct aluminum measurements and genes in breast tumors in a sample of this magnitude. Also, most existing reports on the subject are based on indirect measurements of aluminum^{19,20} or use breast cancer cell lines in controlled laboratory environments, but not

tumors themselves^{4,7,8}. The results obtained from these studies have so far not been sufficient to establish a causal and definite relationship between aluminum and breast carcinogenesis.

While some research supports the evidence found by us, that aluminum is not associated with breast cancer development^{19,20,21}, other studies evaluating aluminum concentration in tissues describe potential mechanisms whereby it might directly interfere in tumor development^{2,4,7,22,23,24,25,26}. The concern as to whether aluminum exposure is a potential health hazard dates back to the 1970s^{27,28,29}. Previous studies have shown that trace elements, such as lead, copper, zinc, iron, aluminum and other metals, might play an important role in biological mechanisms, including enzyme regulation, cell membrane element transport, linkage to binding sites and formation of free-radicals. These effects are known to cause damage to the human body and might contribute to tumor development^{30,31,32}. There is special concern about aluminum entering the body through the skin after antiperspirant application. Cosmetics also make extensive use of aluminum chloride, aluminum chlorohydrate and aluminum zirconium chlorohydrate glycine complexes. It has been demonstrated that these compounds are absorbed by *in vitro* cell lines and by the skin itself^{4,26,33}. Also, the occidental custom of shaving the axilla before applying the antiperspirant could potentiate the absorption of these compounds^{3,8}. Once the aluminum has crossed the skin barrier, the initial hypothesis has been that it could bind the estrogen receptor, enter the cell membrane and reach the nucleus, where it could directly bind cell DNA to cause genomic instability and carcinogenesis^{1,4}.

We observed that aluminum concentration in the peripheral areas of tumors was slightly higher than that in the central regions. The leading peripheral areas could be undergoing more intense tumor development than the central areas, which may in theory increase the aluminum uptake by these rapidly proliferating cells. It is also known that chromosome aberrations leading to carcinogenesis occur at an early phase of tumor development (in general, up until *in situ* lesions have developed), after which relatively few new aberrations occur³⁴.

As mentioned earlier, most research on the hazardous potential of aluminum in breast pathology is focused on its effects as a xenoestrogen and on the assumption that the metal may affect genomic stability^{1,5,35}. However, recent lines of evidence, including our findings, suggest that this may be misleading. since aluminum concentration seems to determine tissue microenvironment modifications instead of affecting genome stability. Manello et al.²³ showed that nipple aspirate fluids (NAFs) of women with breast cancer contain more aluminum than that of women with no breast cancer. The NAFs aluminum concentration was also higher than that of blood, serum or milk from the same women, which might be related to the preferential accumulation of aluminum in certain types of cells and/or tissues due to their morphology and metabolism. Moreover, these aluminum levels were related to the presence of higher ironbinding proteins (ferritin and transferrin), which in turn may provoke modifications in iron homeostasis within the microenvironment. Another study, that used breast cancer cell lines, demonstrated that aluminum chloride (AICl₃), one of the most common compounds of antiperspirants, induced proliferation,

stress and anchorage-independent growth, emergence of double-stranded breaks in DNA and senescence in cell cultures, which are related to malignant transformation in cells⁸. These findings corroborate the assumption that aluminum might somehow influence cells and their framework, either directly or indirectly.

We consider it important that *in vitro* studies continue to be performed to elucidate the possible effects of aluminum in the development of breast tumors. However, our study shows that in tumors resected from breast cancer patients, genomic aberrations of important breast-cancer related genes such as *ERBB2*, *C-MYC* and *CCND1*, are not directly associated with aluminum concentration. Together with existing evidence, our study suggests that it would prove more productive if future investigations are directed towards examining aluminum effects on the cell microenvironment rather than gene stability.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), grants 2008/02469-8 and 2009/06148-4. The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Darbre PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol 2006a; 20:121–143.
- 2. Exley C, Charles LM, Barr L, Martin C, Polwart A, Darbre PD. Aluminium in human breast tissue. J Inorg Biochem 2007; 101:1344–1346.
- McGrath KG. An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. Eur J Cancer Prev 2003; 12:479–485.
- 4. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. J Inorg Biochem 2005; 99:1912–1919.
- Darbre PD. Metalloestrogens: na emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. J Appl Toxicol 2006b; 26:191–197.
- Ellsworth DL, Ellsworth RE, Love B, Deyarmin B, Lubert SM, Mittal V, et al. Outer Breast Quadrants Demonstrate Increased Levels of Genomic Instability. Annals Surg Oncol 2004; 11(9):861–868.
- 7. Darbre PD, Pugazhendhi D, Mannello F. Aluminium and human breast diseases. J Inorg Biochem 2011; 105(11):1484–1488.
- Sappino AP, Buser R, Lesne L, Gimelli S, Béna F, Belin D, Mandriota SJ. Aluminium chloride promotes anchorage independent growth in human mammary epithelial cells. J Appl Toxicol 2012; 32(3):233–243.
- Carvalho ML, Magalhães T, Becker M, von Bohlen A. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. Spectrochim Acta Part B 2007; 62:1004–1011.

- Millos J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendicho C. Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwaveassisted digestion. Analit Chim Acta 2008; 622:77–84.
- Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH. Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. Clin Chim Acta 2010; 411:531–539.
- Siddiqui MKJ, Jyoti, Singh S, Mehrotra PK, Singh K, Sarangi R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. Envir Int 2006; 32:630–637.
- Rodrigues-Peres RM, Cadore S, Febraio S, Heinrich JK, Serra KP, Derchain SFM, Vassallo J, Sarian LO. Aluminum concentration in central and peripheral areas of malignant breast lesions do not differ from those in normal breast tissues. BMC Cancer 2013; 13:104.
- Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-*ERBB2*, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. Jpn J Clin Oncol 2007; 37(9):708–714.
- Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. Journal Histochem Cytochem 2004; 52(4):501–517.
- 16. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. J Clin Oncol 2007; 25(1):118–145.

- 17. Santos MC, Sousa RA, Cadore S, Nóbrega JA, Barnes R, Tatro M. Sample Preparation in Alkaline Medium. Spectrochim Acta, Part B 2006; 61:465–495.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2012. http://www.Rproject.org/. Accessed 14/01/2013.
- 19. Fakri S, Al-Azzawi A, Al-Tawil N. Antiperspirant use as a risk factor for breast cancer in Iraq. East Mediterr Health J 2006; 12(3/4):478–482.
- 20. Mirick DK, Davia S, Thomas DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. J N Cancer Inst 2002; 94(20):1578–1580.
- Namer M, Luporsi E, Gligorov J, Lokiec F, Spielmann M. L'utilisation de déodorants/antitranspirants ne constitue pas um risque de cancer du sein. Bull Cancer 2008; 95(9):871–880.
- 22. Guillard O, Fauconneau B, Olichon D, Dedieu G, Deloncle R. Hyperaluminemia in a woman using an aluminium-containing antiperspirant for 4 years. Am J Med 2004; 117:956–959.
- 23. Manello F, Tonti GA, Medda V, Simone P, Darbre PD. Analysis of Aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. J Appl Toxicol 2011; 31:262–269.
- 24. NG K-H, Bradley DA, Looi L-M. Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. Br J Radiol 1997; 70:375–382.
- 25. Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH. Comparative evaluation of trace metal distribution and correlation in human malignant and benign breast tissues. Biol Trace Elem Res 2008; 125:30–40.
- Romanowicz-Makowska H, Forma E, Bryś M, Krajewska WM, Smolarz B. Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer. Pol J Pathol 2011; 62(4):257–261.

- 27. De Boni U, Scott JW, Crapper DR. Intracellular aluminum binding; a histochemical study. Histochem 1974; 40:31–37.
- 28. Ganrot PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. Environ Health Perspect 1986; 65:363–441.
- 29. Karlik SJ, Eichhorn GL, Lewis PN, Crapper, DR. Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. Biochem 1980; 19:5991–5998.
- Dobson CB, Day JP, King SJ, Itzhaki RF. Location of aluminium and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 152(1):145–152.
- Ionescu JG, Novotny J, Stejskal V, Lätsch A, Blaurock-Busch E, Eisenmann-Klein M. Increased levels of transition metals in breast cancer tissue. Neuro Endocrinol Lett Suppl 2006; 1:36–39.
- 32. Platt B, Fiddler G, Riedel G, Henderson Z. Aluminium toxicity in the rat brain: histochemical and immunocytochemical evidence. Brain Res Bull 2001; 55(2):257–67.
- Flarend R, Bin T, Elmore D, Hem SL. A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. Food Chem Toxicol 2001; 39(2):163–16.
- 34. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. Nat Genet 2003; 34(4):369–376.
- 35. Harvey PW. Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. J Appl Toxicol 2003; 23:285–288.

Step	Temperature (°C)	Ramp Time (s)	Hold time (s)	Flow rate (mL min ⁻¹)
Drying	110	1	30	250
Drying	130	15	30	250
Pyrolysis	1500	10	20	250
Atomization	2350	0	5	0
Cleaning	2450	1	3	250
Cooling	20	1	5	250

 Table 1. Optimized heating program for GFAAS measurements

Characteristic	Ν	%
Age at diagnosis		
<40	17	14.4
<u>></u> 40	101	85.6
Age at menarche		
<12	43	42.6
>12	68	57.4
Unknown	1	
Parity	47	10.0
	17	16.2
	75	12.4 71 <i>/</i>
Unknown	13	/1.4
Age at first pregnancy		
<35	86	94.5
>35	5	5.5
Unknown	27	
Breastfed offspring		
Yes	80	76.9
No	24	23.1
Unknown	14	
Menopausal status		
Pre	36	34.3
Post	69	65.7
Unknown	13	
Age at menopause		
<50	43	67.2
>50 Linknown	21	32.8
	54	
Hormone Therapy	4.4	16.0
No	57	10.2
Linknown	50	00.0
Steroid recentors	00	
Negative	30	27.3
1 Positive	80	72.7
Unknown	8	
Al concentration in central tumor areas		
Trace	31	26.3
0.05–2.0mg/kg	63	53.4
>2.0 mg/kg	24	20.3
Al concentration in peripheral tumor areas		
Trace	18	15.2
0.05–2.0mg/kg	74	62.7
>2.0 mg/kg	26	22.1

Table 2. Key epidemiological and clinical features of the women

AI = aluminum
Table 3. Comparison of aluminum concentration in the central and peripheraltumor regions

Aluminum concentration per tumor region (mg/kg)									
Peripheral	Trace	0.05–2.0 mg/kg	>2.0 mg/kg	ICC					
Trace	13	3	2						
0.05–2.0 mg/kg	13	53	8	0.41					
>2.0 mg/kg	5	7	14						

ICC = Intraclass Correlation Coefficient

		Alumir	num conce	entration	per tumo	r region (mg/kg)
Gene status	Ν		Central		ſ	Periphera	I
		Mean	SD	р	Mean	SD	Р
CCND1							
Normal status	94	1.68	3.08	0.59	2.31	6.58	0.39
Only amplification	15	1.22	1.11		0.88	0.55	
Only aneuploidy	8	4.66	10.66		1.46	1.02	
Amplification+aneuploidy	1	0	NC		4.05	NC	
С-МҮС							
Normal status	78	2.05	4.49	0.15	2.35	6.98	0.16
Only amplification	34	0.88	0.83		1.57	3.02	
Only aneuploidy	0	NC	NC		NC	NC	
Amplification+aneuploidy	6	3.99	5.12		1.47	1.43	
ERBB2							
Normal status	87	2.01	4.27	0.27	2.44	6.75	0.09
Only amplification	21	1.32	2.97		0.88	0.84	
Only aneuploidy	3	0.40	0.69		0.26	0.22	
Amplification+aneuploidy	7	1.44	1.30		2.10	3.96	

Table 4. Aluminum concentration in relation to individual gene statuses

SD = standard deviation; NC = non-computable



Figure 1. Diagram showing the locations of the tissue samples obtained from each subject. Surgical specimens and lesion dimensions varied from subject to subject. *Resection margins apply to conservative surgeries (quadrantectomies). For patients treated with radical mastectomy, the resection margins were considered the boundaries of the resected organ.

4. Discussão

Este estudo detectou concentrações de alumínio semelhantes nas regiões centrais e periféricas de tumores de mama, concentrações estas que foram semelhantes aos níveis de alumínio encontrados nos tecidos normais circundantes. Também não foi possível detectar uma relação positiva entre a concentração de alumínio em carcinomas de mama e alterações em genes sabidamente associados ao câncer de mama. Os resultados deste estudo sugerem que não existe um gradiente de concentração de alumínio a partir de tecido da mama normal em direção ao tecido central dos tumores de mama.

A relação entre a exposição ao alumínio e o câncer da mama tem sido aventada há cerca de duas décadas. No entanto, existem desafios técnicos envolvidos na medição do teor do metal em tecidos humanos. Isto é especialmente verdadeiro para os tecidos da mama, que contêm um elevado teor de gordura, tornando difícil a preparação das amostras. Os primeiros estudos utilizaram medições indiretas do teor de alumínio em tecidos da mama como, por exemplo, questionários que abordam o uso de antitranspirantes contendo alumínio (31,32). Mais recentemente, técnicas de medição direta da concentração de alumínio vêm sendo utilizadas (36,37). Deve-se notar que mesmo pequenas diferenças na concentração de alumínio podem ter importância biológica, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que concentrações de 4nmol/g do metal podem exercer efeitos pró-estrogênicos e possivelmente cancerígenos (16).

Neste estudo, tentou-se aprimorar a técnica para a guantificação do teor de alumínio na mama humana. fazendo uso de uma amostra de tecidos mamários normais e doentes, derivados das mesmas pacientes. Pasha et al. (37), examinando lesões mamárias benignas e malignas (o tecido mamário normal não foi examinado) em um conjunto de 114 pacientes, não encontraram nenhuma diferenca na concentração de alumínio entre os dois grupos. Em outro estudo (16), o teor de alumínio foi medido em amostras de tecido da axila, regiões laterais, centrais e mediais da mama, em um grupo de 17 pacientes que haviam sido submetidas à mastectomia. Estes autores relataram uma concentração significativamente mais elevada de alumínio nas regiões mais laterais (axila e quadrantes externos) em relação às mais mediais da mama (quadrantes internos e centrais), embora não tenha sido exatamente esta a terminologia usada pelos autores para designar as regiões mamárias. Já neste estudo, a concentração de alumínio não diferiu entre os quadrantes mamários. No entanto, vale ressaltar que o presente estudo foi desenvolvido para avaliar as diferenças nas concentrações de alumínio entre as áreas centrais e periféricas de tumores de mama, mas não para avaliar as diferenças nas concentrações de alumínio entre os quadrantes do órgão.

Em comparação com outros estudos, este trabalho detectou baixas concentrações de alumínio em tecidos de câncer de mama e de amostras de mama normal. Diferenças relacionadas com a coleta das amostras e com seu processamento podem ter contribuído para esses resultados divergentes. Embora na maioria dos estudos fossem relatados valores médios de alumínio para os tecidos normais e cancerosos no intervalo de 3,63 a 19,5µg/g (36,37,38), os resultados obtidos neste estudo mostraram valores de 1,68µg/g para as amostras normais da mama e 1,88 a 2,1µg/g para as amostras de câncer (vale notar que foi preciso converter as unidades de medida para fazer tais comparações, uma vez que não há padronização nas unidades de medidas para apresentação das concentrações de alumínio entre os estudos).

No presente estudo, foi observado que a concentração de alumínio nas zonas periféricas dos tumores foi ligeiramente mais elevada do que nas regiões centrais. As áreas periféricas de tumores podem estar em desenvolvimento mais intenso do que as áreas centrais, o que pode, teoricamente, levar ao aumento da absorção do alumínio por essas células. Sabe-se também que as aberrações cromossômicas que podem levar à carcinogênese ocorrem em uma fase precoce do desenvolvimento do tumor (em geral, nas lesões *in situ*), ocorrendo relativamente poucas novas aberrações após esse período de formação inicial do tumor (39). Especulativamente, esta tendência também pode ser atribuível ao aumento da captação do alumínio pelas células epiteliais em transformação durante a carcinogênese e desenvolvimento tumoral, ou então à acumulação preferencial de alumínio devido à bioquímica de tecidos tumorais e possíveis ligações com

outros elementos que propiciariam essa acumulação (40). Também é possível especular que as regiões exteriores do tumor podem concentrar maiores quantidades de alumínio devido à absorção pelo sistema imune da pele axilar (19).

Existem poucos estudos considerando medições diretas de alumínio e suas implicações em genes associados aos tumores de mama, sobretudo em uma amostra da magnitude da usada neste estudo. Outro aspecto importante, já mencionado, é o de que a maioria dos estudos existentes sobre o assunto é baseada em medições indiretas de alumínio (31,32) ou em linhagens celulares de câncer de mama, portanto realizados em ambientes laboratoriais controlados (15,22,23). Até o momento, não existem evidências clinicas para estabelecer uma relação causal entre a exposição ao alumínio e alterações gênicas relacionadas à carcinogênese mamária.

Embora outras pesquisas suportem a evidência encontrada por este estudo de que o alumínio não está associado ao desenvolvimento do câncer de mama (31,32,41), outros estudos que avaliaram a concentração de alumínio em tecidos humanos descreveram mecanismos que podem interferir diretamente no desenvolvimento do tumor (14,15,16,36,37,38,40,42). Como foi dito anteriormente, a preocupação se a exposição ao alumínio pode ser um perigo à saúde humana remonta ao final da década de 1970 (29,43,44). Estudos realizados desde então têm mostrado que vários metais, como chumbo, cobre, zinco, ferro e alumínio, podem desempenhar um papel importante em mecanismos biológicos, como regulação de enzimas e de elementos de transporte na membrana plasmática, ligação a receptores celulares e formação de radicais livres. Esses eventos são

conhecidos por causarem danos ao corpo humano e podem contribuir para o desenvolvimento de tumores (26.27.45). Existe uma preocupação especial sobre o alumínio, uma vez que este pode adentrar o organismo através da pele, após a aplicação de anti-transpirantes, entre outras formas menos comuns de exposição. Esse tipo de cosmético faz amplo uso de cloreto de alumínio, cloridrato de alumínio e cloridróxido de alumínio e zircônio e seus complexos com glicina. Tem sido demonstrado que estes compostos são absorvidos in vitro por linhagens de células e pela própria pele (15,19,38). Além disso, o costume ocidental de depilar a axila antes de se aplicar o antitranspirante pode também potencializar a absorção destes compostos (17,23). Uma vez que o alumínio atravessa a barreira da pele, a hipótese inicial é a de que ele poderia ligar-se ao receptor de estrogênio, entrar através da membrana celular e atingir o núcleo, ligando-se diretamente ao DNA, causando instabilidade genômica e levando à carcinogênese (15,18,21,46). No entanto, linhas recentes de pesquisa, onde os nossos achados se encaixam, sugerem que essas hipóteses podem não ser confirmadas, uma vez que a concentração de alumínio parece determinar modificações teciduais no microambiente tumoral ao invés de afetar a estabilidade genômica.

Manello et al. (40) mostraram que fluidos aspirados de mamilo ("NAFs", do inglês *nipple aspirate fluid*) de mulheres com câncer de mama contêm mais alumínio do que os de mulheres sem câncer de mama. A concentração de alumínio nos NAFs também foi maior do que no sangue e leite obtidos das mesmas mulheres, o que pode estar relacionado com o acúmulo preferencial de alumínio em certos tipos de células e/ou tecidos, devido à sua morfologia e metabolismo. Além disso, estes níveis de alumínio foram relacionados com maior presenca de proteínas de ligação de ferro (ferritina e transferrina), que, por sua vez, podem provocar alterações no microambiente e influenciar na homeostase do ferro. Outro estudo utilizando linhagens celulares de tumores de mama demonstrou que o cloreto de alumínio (AICI₃), um dos compostos mais utilizados em antiperspirantes, induziu à proliferação, estresse, crescimento independente de ancoragem, aparecimento de guebras na cadeia dupla de DNA e senescência em culturas de células, fatores relacionados com a malignização dessas células (23). A possível interação entre o alumínio e outros oligoelementos, como o cálcio, foi também discutida em outras pesquisas. Sabe-se que a proteína de ligação ao cálcio, a osteopontina, forma complexos estáveis com o alumínio. Também tem sido demonstrado que tanto lesões da mama malignas ou não, frequentemente apresentam microcalcificações, que por sua vez, apresentam quantidades significativas de cálcio (40,47,48). Estes achados corroboram a hipótese de que o alumínio pode estar influenciando de alguma forma as células e seu microambiente, diretamente ou não.

Foi encontrada uma associação significativa entre a idade e a menopausa, com concentração de alumínio nas regiões periféricas dos tumores. Isto pode ser atribuído ao efeito cumulativo pelo tempo de exposição da mulher a compostos de alumínio como, por exemplo, o uso contínuo de antiperspirantes à base de cloreto ou cloridratos de alumínio. Porém, resultados semelhantes a estes nunca foram relatados anteriormente, carecendo, portanto, de confirmação independente. No entanto, o estudo de Manello et al. (40) demonstrou que os fluidos aspirados do mamilo de mulheres na pós-menopausa, com câncer de mama, tinham níveis mais elevados de alumínio que aqueles aspirados de mulheres mais jovens. Existem, também, estudos demonstrando que a idade pode estar relacionada com a acumulação de alumínio ao longo do tempo, em diversas regiões do organismo (15,17,40).

Considerou-se importante que estudos *in vitro* continuem a serem feitos de forma a elucidar possíveis efeitos do alumínio no desenvolvimento de tumores de mama. Este estudo mostra que, nos tumores obtidos de pacientes com câncer de mama, as aberrações cromossômicas de importantes genes para esse tipo de tumor, como *ERBB2, C-MYC* e *CCND1*, não estão diretamente associadas à concentração de alumínio nos tecidos mamários. Juntamente com os resultados de outros trabalhos, o presente estudo sugere que poderia ser mais produtivo se as investigações futuras fossem direcionadas a examinar os efeitos do alumínio sobre o microambiente celular, ao invés de investigar a instabilidade genômica desses tumores.

Em conclusão, este estudo sugere que a quantidade de alumínio encontrada em tumores da mama não diferiu significativamente da encontrada nos tecidos normais adjacentes da mama. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de alumínio relacionadas com a localização ou outras características tumorais relevantes, salvo a idade e estado de menopausa nos tecidos periféricos, bem como não foi encontrada associação entre as concentrações de alumínio tecidual e a estabilidade dos genes fundamentais na carcinogênese mamária.

5. Conclusões

- Artigo 1: As concentrações de alumínio encontradas nas regiões centrais e periféricas de tumores de mama e nos tecidos normais circundantes apresentaram valores semelhantes.
- Artigo 2: Não foi possível detectar uma relação positiva entre a concentração de alumínio em carcinomas de mama e alterações em genes fundamentais na carcinogênese e desenvolvimento tumoral mamário.

6. Referências Bibliográficas

- França, International Agency for Research on Cancer. IARC Handbook of Cancer Prevention Volume 7, Chapter 1 [on line] 2002. Lyon. Disponível em: URL: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook7/ Handbook7_Breast-1.pdf [acesso em 21de fevereiro de 2013].
- Brasil, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2012, Incidência de Câncer no Brasil, INCA [*on line*]. Rio de Janeiro. Disponível em: URL: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5 [acesso em 06 de novembro de 2012].
- 3. Buchholz TA, Weil MM, Story MD, Strom EA, Brock WA, McNeese MD. Tumor suppressor genes and breast cancer. Radiat Oncol Invest. 1999; 7:55-65.
- 4. Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2002; 46 (4):351-60.
- Janocko LE, Brown KA, Smith CA, Gu LP, Pollice AA, Singh SG et al. Distinctive patterns of Her-2/neu, c-myc, and cyclin D1 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in primary human breast cancers. Cytometry. 2001; 46:136-49.

- Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. Cancer Res. 2004; 64: 8534-40.
- Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-*ERBB2*, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. Jpn J Clin Oncol. 2007; 37(9):708-14.
- 8. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Egawa C, Kasugai T, Takami S, Inazawa J et al. Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization Cancer. 2001; 93 (2):165-70.
- Freire-Maia DV, Bortolai A. FISH Fluorescence in situ hibridization. [apostila]. São Paulo (SP): Citogem; 2003.
- Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007; 25(1):118-45.
- 11. Heinrich JKR. CA 125 e HER-2/neu em tumores de ovário do tipo borderline

 estudo imunohistoquímico e por hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*)
 [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.
- 12. Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. J Mol Hist. 2007; 38:151:7.
- Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. J Histochem Cytochem. 2004; 52(4):501-7.
- Ellsworth DL, Ellsworth RE, Love B, Deyarmin B, Lubert SM, Mittal V et al. Outer breast quadrants demonstrate increased levels of genomic instability. Ann Surg Oncol. 2004; 11 (9):861-8.

- 15. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. J Inorg Biochem. 2005; 99:1912-9.
- 16. Exley C, Charles LM, Barr L, Martin C, Polwart A, Darbre PD. Aluminium in human breast tissue. J Inorg Biochem. 2007; 101:1344-6.
- McGrath KG. An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. Eur J Cancer Prev. 2003; 12:479:85.
- Darbre PD. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. J Appl Toxicol. 2006a; 26:191-7.
- Flarend R, Bin T, Elmore D, Hem SL. A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. Food Chem Toxicol. 2001; 39(2):163-8.
- 20. Exley C. Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease? Mol Med Today. 1998; 4(3):107-9.
- 21. Darbre PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006b; 20:121-43.
- 22. Darbre PD, Pugazhendhi D, Mannello F. Aluminium and human breast diseases. J Inorg Biochem. 2011; 105(11):1484-8.
- Sappino AP, Buser R, Lesne L, Gimelli S, Béna F, Belin D, Mandriota SJ. Aluminium chloride promotes anchorage independent growth in human mammary epithelial cells. J Appl Toxicology. 2012; 32(3):233-43.
- 24. Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH. Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. Clin Chim Acta. 2010; 411: 531–9.

- 25. House E, Esiri M, Forster G, Ince PG, Exley C. Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study. Metallomics. 2012; 4(1):56-65.
- Dobson CB, Day JP, King SJ, Itzhaki RF. Location of aluminium and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes. Toxicol Appl Pharmacol. 1998; 152(1):145-52.
- Platt B, Fiddler G, Riedel G, Henderson Z. Aluminium toxicity in the rat brain: histochemical and immunocytochemical evidence. Brain Res Bull. 2001; 55(2):257-67.
- Lukiw WJ, Percy ME, Kruck TP. Nanomolar aluminium induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. J Inorg Biochem. 2005; 99:1895-8.
- 29. Karlik SJ, Eichhorn GL, Lewis PN, Crapper, DR. Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. Biochem. 1980; 19:5991:98.
- 30. Estados Unidos da América, Food and Drugs Administration, Department of Health and Human Services. Antiperspirant Drug Products for Over-The-Counter Human Use; Final Monograph Volume 68, Number 110, Rules and Regulations [on line] Jun 2003. Federal Register. Disponível em: URL: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/Develo pmentResources/Over-the-CounterOTCDrugs/StatusofOTCRulemakings/ucm110774.pdf [acesso em 12 de julho de 2012].
- 31. Mirick DK, Davia S, Thomas DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. J N Cancer Inst. 2002; 94 (20):1578-80.
- 32. Fakri S; Al-Azzawi A; Al-Tawil N. Antiperspirant use as a risk factor for breast cancer in Iraq. East Mediterr Health J. 2006; 12 (3/4):478-82.

- Carvalho ML, Magalhães T, Becker M, von Bohlen A. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. Spectrochim Acta Part B. 2007; 62:1004-11.
- 34. Millos J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendicho C. Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwaveassisted digestion. Anal Chim Acta. 2008; 622:77-84.
- 35. Siddiqui MKJ, Jyoti, Singh S, Mehrotra PK, Singh K, Sarangi R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. Environ Int. 2006; 32:630-7.
- 36. NG K-H, Bradley DA, Looi L-M. Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. Br J Radiol. 1997; 70:375-82.
- Pasha Q, Malik SA, Iqbal J, Shaheen N, Shah MH. Comparative evaluation of trace metal distribution and correlation in human malignant and benign breast tissues. Biol Trace Elem Res. 2008; 125:30-40.
- Romanowicz-Makowska H, Forma E, Bryś M, Krajewska WM, Smolarz B. Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer. Pol J Pathol 2011; 62(4):257-61.
- 39. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. Nat Genet. 2003; 34(4):369-76.
- 40. Manello F, Tonti GA, Medda V, Simone P, Darbre PD. Analysis of aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. J Appl Toxicol. 2011; 31:262-9.

- Namer M, Luporsi E, Gligorov J, Lokiec F, Spielmann M. L'utilisation de déodorants/antitranspirants ne constitue pas um risque de cancer du sein. Bull Cancer. 2008; 95(9):871-80.
- Guillard O, Fauconneau B, Olichon D, Dedieu G, Deloncle R. Hyperaluminemia in a woman using an aluminium-containing antiperspirant for 4 years. Am J Med. 2004; 117:956-9.
- 43. De Boni U, Scott JW, Crapper DR. Intracellular aluminum binding; a histochemical study. Histochem. 1974; 40:31-7.
- 44. Ganrot PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. Environ Health Perspect. 1986; 65:363-441.
- Ionescu JG, Novotny J, Stejskal V, Lätsch A, Blaurock-Busch E, Eisenmann-Klein M. Increased levels of transition metals in breast cancer tissue. Neuro Endocrinol Lett. 2006; Suppl 1:36-9.
- 46. Harvey PW. Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. J Appl Toxicol. 2003; 23:285-8.
- Rowatt E, Sorensen ES, Triffit J, Viess A, Williams RJP. An examination of the binding of Aluminum to protein and mineral components of bone and teeth. J Inorg Biochem. 1997; 68(4): 235-8.
- 48. Baker R, Rogers KD, Shepherd N, Stone N. New relationships between breast microcalcifications and cancer. Br J Cancer. 2010; 103: 1034-9.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados

Instabilidade genômica detectada por *FISH* (hibridização *in situ* por fluorescência) em neoplasias malignas da mama em função da presença do receptor de estrogênio e da concentração de alumínio intracelular

Dados do caso

Nome:				Número:					
HC:	ldade:	anos	Data da cirurg	jia: <u>/</u>	_/				
<u>Cirurgia</u>									
1. Lado:	1 Direito	2 Esquerdo)						
2. Quadrante:	1 QSE	2 QSI	3 QII	4 QIE					
3. Tipo:	1 Lobular ir	nvasivo	2 Ductal inv	vasivo					
4. Grau tumoral:	1 Bem difer 2 Moderada 3 Pouco dif	renciado amente diferen erenciado	ciado						
5. Estado da axila:	1 Negativo	– seguir para i	tem 7	2 Positivo					
6. Quantidade de lir	nfonodos acoi	metidos: 1 l	Jm 2 Dois	3 Três ou n	nais				
Resultados laboratoriais									
7. Receptor de estrogênio: 1 Negativo – seguir para item 9 2 Positivo									
8. Porcentagem de	células com re	eceptor de est	trogênio posit	ivo	_%				

9. Resultado do FISH:

Gene ERBB2

Área	Número de células de acordo com a distribuição de sinais (vermelho (VM) e verde (VD)											Total														
	0/0	0/1	0/2	0/3	0/4	1/0	1/1	1/2	1/3	1/4	2/0	2/1	2/2	2/3	2/4	3/0	3/1	3/2	3/3	3/4	4/0	4/1	4/2	4/3	4/4	
С																										
Р																										
Ν																										

Gene C-MYC

Área	Número de células de acordo com a distribuição de sinais (vermelho (VM) e verde (VD)										Total															
	0/0	0/1	0/2	0/3	0/4	1/0	1/1	1/2	1/3	1/4	2/0	2/1	2/2	2/3	2/4	3/0	3/1	3/2	3/3	3/4	4/0	4/1	4/2	4/3	4/4	
С																										
Р																										
Ν																										

Gene CCND1

Área	Número de células de acordo com a distribuição de sinais (vermelho (VM) e verde (VD)										Total															
	0/0	0/1	0/2	0/3	0/4	1/0	1/1	1/2	1/3	1/4	2/0	2/1	2/2	2/3	2/4	3/0	3/1	3/2	3/3	3/4	4/0	4/1	4/2	4/3	4/4	
С																										
Р																										
N																										

10. Quantidade média de alumínio intracelular encontrado

7.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Instabilidade genômica em neoplasias malignas da mama em função da presença do receptor de estrogênio e da concentração de alumínio intracelular

Pesquisadora Responsável: Raquel Mary Rodrigues

Nome:	HC:
Idade:	RG:
Endereço:	Fone:

Estou sendo convidada a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar se o alumínio, contido em vários produtos, como desodorantes e alimentos, pode estar relacionado a alterações nas células e à formação do câncer de mama.

Tenho o livre direito de aceitar participar ou não, sem que isso cause qualquer prejuízo no meu atendimento no Serviço de Oncologia Mamária do .

Meus dados como nome, telefone, endereço, serão mantidos em sigilo e minha participação não implicará em qualquer prejuízo para minha saúde.

Caso aceite participar:

- Os dados de meu prontuário serão colocados à disposição de uma pesquisadora, que estará autorizada a copiá-los em ficha de coleta de dados previamente elaborada para este estudo.
- Uma pequena parte do tumor que vier a ser retirado de minha mama será utilizada para dosar o alumínio e verificar se existem alterações no material genético (genes *C-MYC* e ERBB-2) das células. Não haverá prejuízo do meu diagnóstico, ou seja, a parte do tumor que vier a ser retirada para a pesquisa não fará falta para estabelecer que doença eu tenho e qual o tratamento a ser utilizado.
- Sei que a qualquer momento poderei sair do estudo, sem que isso interfira no meu atendimento no.
- Aceito que uma parte do tumor seja destinada para a participação <u>apenas</u> neste estudo.

 Aceito que uma parte do tumor seja destinada para a participação neste estudo, sendo armazenado um fragmento ou lâminas para estudos futuros, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.

Para outras informações sobre minha participação na pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp pelo telefone (019) 3521.8936.

Ciente de tudo isto, concordo em participar do estudo.

Data: ___/__/___

Participante e/ou Responsável

RAQUEL MARY RODRIGUES Pesquisadora Responsável

Laboratórios Clínicos Especializados Área de Citogenética – /UNICAMP Fone: (019) 3521.9524

7.3. Anexo 3 – Normas para armazenamento de material biológico humano no âmbito de projeto de pesquisa

- 1. Fica sob a responsabilidade do chefe do laboratório de citogenética a guarda e autorização para utilização de todo e qualquer material biológico humano armazenado no laboratório.
- 2. O armazenamento de materiais biológicos humanos no laboratório de citogenética justifica-se na necessidade e oportunidade de realizar novas pesquisas no futuro.
- 3. Só serão armazenadas amostras de material biológico humano quando provida de "Consentimento Livre Esclarecido" assinado pelo sujeito doador e, no qual esteja incluída, de forma clara, a informação de que está previsto o armazenamento de amostras para uso em pesquisas futuras.
- A utilização do material biológico humano armazenado atenderá, exclusivamente, os objetivos ou aplicações descritas em projetos de pesquisas aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição.
- 5. O sigilo e respeito à confidencialidade, bem como, a possibilidade de rastreamento dos dados e da origem das amostras serão garantidos por um sistema de codificação.
- 6. O sistema de codificação das amostras será definido pelo responsável pela guarda do material biológico juntamente com o pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa que gerou a necessidade de armazenamento da amostra.
- 7. A possibilidade de contato com os doadores para fornecimento de informação de seu interesse (por exemplo, resultados de exames para acompanhamento clínico ou aconselhamento genético) ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa será garantida pelos dados cadastrais dos sujeitos mantidos pela instituição onde a pesquisa é realizada.
- 8. Os materiais biológicos armazenados no laboratório serão mantidos, em princípio, pelo período de 5 anos a partir da coleta da amostra. O prolongamento do período de armazenamento das amostras dependerá da autorização do CEP, mediante a solicitação do depositário, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.
- 9. O material biológico humano crio-preservado será depositado em sistema de congelamento validado, observando um local fixo e pré-determinado que permita a sua localização com facilidade, rapidez e segurança.
- 10. Será mantido um registro das condições dos congeladores ou dos contêineres de armazenamento, documentando a temperatura ou o nível de nitrogênio.

7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação do projeto no CEP - FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

() www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 21/11/07. (Grupo III)

PARECER CEP: N° 705/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0503.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INSTABILIDADE GENÔMICA EM NEOPLASIAS MALIGNAS DA MAMA EM FUNÇÃO DA PRESENÇA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO E DA CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO INTRACELULAR". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Mary Rodrigues INSTITUIÇÃO: CAISM / UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/10/2007 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Determinar a instabilidade dos genes C-MYC e ERBB2 no tecido tumoral da mama e suas relações com o receptor de estrógeno e a presença de alumínio intracelular.

III - SUMÁRIO

Será um estudo de corte transversal, com tamanho amostral de 67 casos. O material será coletado de mulheres aguardando cirurgia para retirada de neoplasias malignas da mama, na enfermaria de Oncologia Ginecológica e Patologia Mamária do CAISM-UNICAMP. Após seu aceite em participar da pesquisa, o material extirpado será encaminhado para realização de exames de rotina e retirada de fragmento para a pesquisa de receptores de estrogênio por imunohistoquímica, determinação da presença e quantidade de alumínio intracelular por coloração específica e espectrometria de absorção atômica e da instabilidade genômica do C-MYC e ERBB2 pela técnica de FISH. A análise preliminar bivariada constará do cálculo de qui-quadrados para avaliar a associação de instabilidade genômica para cada um dos genes em estudo em relação à presença e quantidade de alumínio intracelular (nuclear, citoplasmático ou de membrana). A seguir, serão elaborados modelos de regressão logística, a fim de avaliar a associação da variáveis de controle. O nível de significância assumido será de 5% (p<=0,05 e intervalos de confiança de 95%).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



(\$) www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo PRESIDENTE DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP

7.5. Anexo 5 – Protocolo de produção de sondas para FISH

1. Estabelecimento de culturas, isolamento de colônias de células únicas e verificação da presença da sequência de interesse

- 1.1 Cultivo de bactérias
 - Cultivar as bactérias contendo a sequência de interesse em 15ml de meio LB contendo antibiótico adequado à bactéria cultivada.
 - Incubar *overnight*, a 37°C, em agitador.
- 1.2 Isolamento e culturas de células únicas
 - Estriar as bactérias anteriormente cultivadas em placas contendo meio LB com antibiótico próprio.
 - Incubar *overnight*, a 37°C.
 - Transferir 5-10 colônias para tubos individuais contendo 15ml de meio LB com antibiótico próprio.
 - Armazenar as placas contendo as colônias em geladeira, envoltas em filme plástico.
 - Incubar os tubos com as tampas semi-abertas, *overnight*, a 37°C, em agitador.
- 1.3 Verificação da presença da sequência de DNA de interesse por PCR
 - Adicionar o tampão de lise à suspensão celular da cultura anterior.
 - Aquecer a 95°C por 5 minutos.
 - Colocar em gelo até estar pronto para PCR.
 - Armazenar o restante das culturas em geladeira, envoltas em filme plástico.
 - Preparar a reação para PCR contendo:
 - Enzima Taq polimerase e nucleotídeos
 - Primers (desenhados anteriormente para a sequência em questão, através de ferramentas de biologia molecular específicas)
 - Água estéril
 - Amostra
 - Submeter a mistura à PCR.
 - Verificar o tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose.
 - Escolher a melhor cultura para novo cultivo.
 - Inocular alíquota da cultura escolhida novamente em meio LB, overnight, a 37°C.
 - Congelar amostras de 500µl dessa cultura em freezer -80°C, para cultivos posteriores.

2. Extração de DNA, estimação da concentração e amplificação da sequência de interesse.

- 2.1 Extração e estimação de concentração de DNA
 - Utilizar o protocolo de extração de DNA do QIAmp DNA Mini Kit Qiagen.
 - Estimar a concentação do DNA obtido submetendo a amostra à eletroforese em gel de agarose.
- 2.2 Amplificação da sequência de interesse
 - Proceder com a amplificação das amostras, utilizando o *Repli-g Midi Kit Qiagen.*
 - Diluir o produto obtido e verificar a concentração final submetendo a amostra à eletroforese em gel de agarose.
- 3. Marcação das sequências de interesse por Nick Translation
 - Preparar a reação, conforme Nick Translation Kit Vysis:
 - 1µg de DNA
 - Água destilada estéril
 - Tampão para Nick Translation
 - Nucleotídeos marcados com coloração desejada (geralmente VERDE para sondas centroméricas (controles) e VERMELHO para sondas geneespecíficas)
 - Incubar a 15°C por 3-16h, dependendo do tamanho da sequência que será marcada.
- 4. Preparação da sonda para hibridização
 - Adicionar ao volume pretendido da sonda já marcada:
 - DNA Cot-1 Humano
 - DNA de esperma de salmão
 - Acetato de Sódio 3M, pH 5,2
 - Álcool Etílico P.A.
 - Incubar a -80°C por 40-60 minutos.
 - Centrifugar a 4°C por 30 minutos.
 - Remover o sobrenadante e lavar em álcool etílico 70%.
 - Deixar secar a 37°C por 20-30 minutos.
 - Dissolver o pellet em tampão de hibridização.
 - Incubar a 37°C para proceder com a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou armazenar a -20°C.