

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MATHIAS

ANÁLISE DA MUTAÇÃO R337H *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMAS
MAMÁRIOS ESPORÁDICOS

CURITIBA

2014

CAROLINA MATHIAS

ANÁLISE DA MUTAÇÃO R337H *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMAS
MAMÁRIOS ESPORÁDICOS

Monografia apresentada à disciplina de
Estágio Supervisionado II como requisito à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a.Dr^a Enilze Maria de Souza Fonseca
Ribeiro

Co- Orientador: Prof.Dr.Iglenir João Cavalli

Depto. de Genética – UFPR

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre terem me dado apoio em seguir com o sonho de ser cientista, pela atenção, pelo carinho e por tudo que fizeram por mim, e pela construção da minha carreira.

À Prof.Dra. Enilze Ribeiro, por ter me dado a chance inicial de estudar algo que sempre chamou minha atenção, e me intrigou desde pequena. Pela orientação, pela paciência, pela compreensão e atenção em todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Iglénir Cavalli, por ter confiado a mim esse projeto. Pela orientação nesses três anos, pela atenção e disponibilidade despendida a mim e às minhas inquietações.

À Prof. Dra. Roseli Wassem por ter me ajudado, me motivado, me escutado. Pela paciência, por tudo que me ensinou, e por tudo que ainda vai me ensinar. Por ser um modelo profissional que eu desejo um dia alcançar.

Às minhas amigas Adriana Vasko, Heloísa Brincas, Marcella Cesar, Renata Amorim e Tayana Schultz pela parceria, pelas risadas, pela compreensão, pelas festas, pelas conversas, pelos almoços, pelos conselhos, por estarem sempre presentes nos piores e melhores momentos.

À Simone Fachin, pela amizade durante os 5 anos da graduação, por tudo o que vivemos juntas, pela compreensão, pela parceria, e que apesar da distância neste ano final do curso, me ajudou em todos os momentos que eu precisei. Gostaria que estivesse presente no dia da apresentação desse projeto, mas eu sei que de Londres, você estará mandando muitas energias positivas.

À Carolina Koike por todo esse tempo de compreensão, amizade, risadas, e por tudo que representa na minha vida.

Aos integrantes do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética pela convivência, risadas e apoio nos momentos mais complicados de desenvolvimento do trabalho.

O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.

O que for o teu desejo, assim será tua vontade.

O que for a tua vontade, assim serão teus atos. O que forem teus atos, assim será teu destino.

Brihadaranyaka Upanishad

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e, para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou uma incidência de 57.120 novos casos e 13.345 o número de mortes para 2014 (INCA 2014). A carcinogênese mamária é um processo de várias etapas caracterizado por alterações na constituição genética e epigenética das células e pode se expressar de duas maneiras: doença *in situ* ou invasiva. Mutações no gene supressor de tumor *TP53* são associadas ao desenvolvimento de câncer de mama com prognóstico desfavorável. A mutação R337H *TP53* se caracteriza por codificar uma histidina no lugar de arginina (R337H), no exon 10 do gene *TP53*, no domínio de dimerização da proteína p53. É associada principalmente com o câncer de córtex da glândula adrenal em crianças, e tem uma frequência elevada no sul do Brasil (0,3%). Outros cânceres associados a esta mutação na vida adulta são os de mama e estômago, justificando a presente investigação. O objetivo principal deste projeto é verificar a frequência da mutação R337H, em uma amostra de pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos, atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba, PR. Desta amostra será selecionada uma subamostra de pacientes com idade inferior a 35 anos considerando, que carcinomas diagnosticados nesta faixa etária são considerados mais agressivos. Foram utilizados tumores congelados armazenados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, e a técnica de PCR-RFLP para a avaliação da mutação. Foram genotipadas 314 pacientes para a mutação R337H *TP53* e uma paciente foi identificada como sendo portadora da mutação confirmando até o momento a mesma frequência da população geral. O estudo terá continuidade envolvendo cerca de 3000 pacientes.

Palavras- Chave: Câncer de Mama, *TP53*, Mutação R337H, PCR-RFLP.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO.....	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 CÂNCER DE MAMA.....	9
3.2 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO	10
3.3 SÍNDROME DE LI FRAUMENI E SÍNDROME DE LI FRAUMENI LIKE	11
3.4 A PROTEÍNA p53	13
3.5 DOMÍNIOS DA PROTEÍNA p53.....	14
3.6 A MUTAÇÃO R337H TP53	15
3.7 A MUTAÇÃO R337H TP53 E O CÂNCER DE MAMA.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 ABORDAGEM ÉTICA E EXPERIMENTAL.....	18
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	18
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	19
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	19
4.5 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	20
4.6 ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO.....	21
5.0 RESULTADOS.....	21
6.0 DISCUSSÃO	24
7.0 CONCLUSÃO.....	26
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama vem sendo intensamente estudado nos últimos anos por ter se tornado um problema de saúde pública que atinge um número significativo de mulheres a cada ano. Ampliar os conhecimentos sobre a sua etiologia, causas, meios de diagnóstico precoce efetivos e desenvolver tratamentos são prioridades da oncologia. O estudo do gene supressor de tumor *TP53* resultou na identificação da mutação R337H *TP53*, que se caracteriza por codificar uma histidina no lugar de arginina (R337H), no exon 10 do gene *TP53*, no domínio de dimerização da proteína p53. Esta mutação ocorre em 95% dos pacientes pediátricos portadores de Tumor de Córtex Adrenal (ATC), que ocorre em frequências elevadas no Sul do Brasil, comparativamente a outras regiões e países (MARIGO *et al.*, 1969; PIANOVSKI *et al.*, 2006). Como exemplo, a incidência de TCA na França é 18 vezes mais baixa do que no Estado do Paraná (DESANDES *et al.*, 2004)

A mutação R337H *TP53* é possivelmente associada ao desenvolvimento de câncer de mama com prognóstico desfavorável (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008). Assim, utilizando a técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), o presente projeto tem como objetivo estimar a frequência da mutação R337H *TP53* em pacientes com carcinomas esporádicos de mama atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba, Paraná.

2 OBJETIVO

Estimar a frequência da mutação R337H *TP53* em pacientes com carcinomas mamários esporádicos, atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba, Paraná.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é considerado como o segundo tipo mais freqüente de neoplasia do mundo entre as mulheres. Sua incidência é cada vez maior em países em desenvolvimento, correspondendo a cerca de 69% de mortes pela doença, devido principalmente ao aumento na expectativa de vida e à precariedade de detecção e diagnóstico da doença em países subdesenvolvidos (WHO-*World Health Organization* -WHO Global Burden of Disease,2014).

Uma estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014 sugere o diagnóstico de 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil, e 13.345 mortes pela doença. O alto número de mortes causadas pelo câncer de mama no país deve-se principalmente ao diagnóstico tardio. Segundo o Ministério da Saúde (2014), o rastreamento mamográfico deve ser realizado a cada dois anos em mulheres entre 50 e 69 anos de idade. Cerca de 15-25% da mortalidade resultante da doença poderia ser evitada pela utilização adequada desse método que detecta, em média, de 80-90% dos cânceres de mama em mulheres assintomáticas (JEMAL *et al.*, 2010). Países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, embora apresentem um aumento considerável na incidência, uma redução da mortalidade é observada devido à detecção precoce e ao tratamento adequado das pacientes (WHO, 2010).

O desenvolvimento de tumores mamários é resultado de uma combinação de alterações genéticas e epigenéticas das células. A maioria dessas alterações resulta em morte celular, porém algumas delas podem ocorrer em genes associados à proliferação celular, invasão, caracterizando um processo de carcinogênese (NUSSBAUM, 2008).

As mudanças genéticas e epigenéticas envolvidas na progressão tumoral ocorrem em duas classes principais de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumor.

Os proto-oncogenes são os responsáveis pela ativação da proliferação celular, dessa forma, alterações nesses genes caracterizam um processo de proliferação celular desordenado, propriedade indispensável para o processo de carcinogênese. Os oncogenes são derivados dos proto-oncogenes com ocorrência de mutações ativadoras, com ganho de função ou expressão aumentada. A ativação desses genes pode ocorrer por meio de translocações cromossômicas, ampliações gênicas, superexpressão ou, ainda, mutações de ponto (NUSSABAUM *et al.*,2008). Diversos oncogenes foram caracterizados e estudados no câncer de mama, sendo os principais: *HRAS*, *MYC*, e *HER2*, sendo o último, um dos oncogenes fundamentais para a progressão do câncer de mama. A ativação do gene *HER2*, ocorre em aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama primário (OSBORNE *et al.*, 2004).

Genes supressores de tumor atuam regulando negativamente a proliferação celular e positivamente a morte celular programada (apoptose). Dessa forma, desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma. Entre os genes supressores de tumor identificados como mutados em cânceres de mama pode-se citar: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*.

Fatores epigenéticos estão também envolvidos no processo de carcinogênese mamária. Mudanças no padrão de metilação das ilhas CpG que ocorrem em regiões promotoras de genes supressores de tumor e de outros genes associados ao câncer podem contribuir para o silenciamento transcricional e, de modo geral, estar envolvidas na progressão de neoplasias (READ e DONNAI, 2007).

3.2 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

O câncer de mama hereditário corresponde de 5 a 10% dos casos diagnosticados. Mutações germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* e *CHEK2* são as principais causas do desenvolvimento dessa doença (NUSSBAUM *et al.*,2008).

Duas síndromes principais são características do câncer de mama hereditário: A Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC) e a Síndrome de Li

Fraumeni (LFS). A Síndrome HBOC é herdada de forma dominante, e é caracterizada pelo aparecimento de tumores de mama e/ou ovário em idade precoce.

Aproximadamente 30% das pacientes diagnosticadas com HBOC apresentam mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ou rearranjos genômicos que resultam em uma alteração no número de cópias desses genes. Para as portadoras, o risco de desenvolvimento de câncer até cerca dos 80 anos de idade é de 45-70% para o câncer de mama e 20-40% para o câncer de ovário (CLARK,2011). Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* também conferem um aumento de risco para outros tipos de câncer, como pâncreas, próstata e câncer de mama masculino (DUROCHER, 1996). A avaliação precoce da presença de mutações nesses genes contribui para a tomada de medidas profiláticas. Quando são detectadas alterações nos genes *BRCA1*, por exemplo, pode-se sugerir uma mastectomia e ooforectomia profiláticas, diminuindo consideravelmente o risco da portadora. Além disso, quando mutações são detectadas pelo diagnóstico molecular, o teste genético pode ser estendido para familiares da paciente analisada, ampliando o programa de prevenção (PELVITRIS, 2006).

3.3 SÍNDROME DE LI FRAUMENI E SÍNDROME DE LI FRAUMENI LIKE

Em 1969, os pesquisadores Frederick Li e Joseph Fraumeni realizaram uma revisão de 280 prontuários e 418 atestados de óbito de crianças que foram diagnosticadas com rhabdomyosarcoma, uma neoplasia maligna da musculatura esquelética. A partir da análise desses resultados, os pesquisadores buscaram informações sobre o histórico familiar dessas crianças. Entre as famílias estudadas, cinco apresentavam um perfil de alta ocorrência de tumores nas gerações avaliadas, incluindo diagnóstico de sarcoma na infância e outros tumores em idade precoce.

A observação da ocorrência de tumores malignos em idade precoce, levou aos pesquisadores Li e Fraumeni, sugerirem um padrão hereditário de transmissão entre essas famílias, foi proposta então, a Síndrome de Li-Fraumeni (LI e FRAUMENI, 1969)

A síndrome de Li Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição ao câncer de caráter autossômico dominante, e é definida clinicamente pela presença de um probando diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos de idade, um parente de primeiro grau com câncer antes dos 45 anos de idade e um parente de primeiro ou segundo grau diagnosticado com câncer antes dos 45 anos ou sarcoma em qualquer idade (LI e FRAUMENI, 1988). Os principais tipos de tumores encontrados na LFS são sarcomas, câncer de mama, leucemia e tumor de córtex adrenal (*International Agency for Research on Cancer - IARC*).

Desde a definição clássica da LFS foi observado que algumas famílias apresentavam algumas características, porém não se enquadravam em todos os critérios da doença. Essas famílias passaram então a ser denominadas como portadoras da Síndrome de Li Fraumeni-like (LFL), que exclui a presença de um probando com sarcoma (BIRCH,1994).

A LFS é causada principalmente por mutações germinativas no gene supressor de tumor *TP53* (FUNK et al.,1992; JACKS et al., 1994). Estudos iniciais analisavam mutações que ocorriam nos exons 5-8, região de ligação ao DNA. A maioria das mutações observadas nessa região é classificada como *missense* e atuam bloqueando a ação de fator de transcrição da proteína p53 (OLIVER *et al.*, 2010). Foram identificadas mutações no gene *TP53* fora da região de ligação ao DNA, assim como rearranjos e deleções que expandiram as possibilidades de mutações neste gene na LFS.

A LFS é uma síndrome altamente penetrante. Indivíduos diagnosticados como portadores de mutações germinativas no gene *TP53* apresentam aproximadamente 50% de chance de desenvolver câncer antes dos 40 anos de idade, comparada com a chance de 1% da população geral (BIRCH *et al.*,1998).

3.4 A PROTEÍNA p53

O *TP53* - tumor protein p53 – (Genetics Home Reference, 2012) identificado como um gene supressor de tumor no final da década de 80 (FINLAY e LEVINE, 1989), está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (McBRIDE, MERRY e GIVOL, 1986). Contém 11 exons e codifica uma fosfoproteína nuclear tetramérica de 53 Kilodaltons (kDa), denominada proteína 53 (p53).

A proteína p53 humana é composta por 393 aminoácidos (aa) e é classificada como um ativador transcricional (LEVINE, 1997). A porção aminoterminal (142 aa) possui aminoácidos ácidos que são necessários para a interação com fatores associados à transcrição de outras proteínas (como Mdm2). A carboxila terminal (aa 311-393) é rica em aminoácidos básicos e contém três sinais nucleares: um domínio para dimerização/oligodimerização, um domínio regulatório negativo que modula a atividade da p53 e um domínio central (aa 102-290), responsável pela sequência específica de ligação ao DNA. A p53 normal liga-se seletivamente ao sítio alvo do DNA.

A proteína p53 é expressa em muitos tipos celulares, estando na sua forma inativa ou latente, em concentrações muito baixas sob condições normais (OKOROKOV et al., 2006; ROSSNER et al. 2010) devido à ação realizada pela ubiquitina E3-ligase Mdm2/Hdm2, por meio de dois mecanismos: promovendo a liberação da p53 para o citoplasma e sua consequente degradação pelo proteassomo, e bloqueando seu domínio de transativação (SUTCLIFFE e BREHM, 2004; BERTHEAU et al., 2008; MARCEL e HAINAUR, 2009).

Em células expostas a sinais de estresse, primariamente genotóxicos, a p53 se torna estável através de modificações pós-traducionais que não permitem a sua degradação, e se acumula na célula. Uma vez ativada, a p53 vai exercer vários efeitos antiproliferativos, determinados de acordo com a intensidade do dano, através da indução de genes alvos envolvidos com a regulação do ciclo celular, reparo do DNA, senescência, apoptose e angiogênese (ROSSNER. *et al.*, 2010).

Células que não apresentam o gene *TP53*, ou o apresentam inativado, não desencadeiam essas respostas e continuam a se dividir, replicando o DNA sem que

ocorra reparo de quebras e de outras lesões no DNA decorrentes de estresse (BRAITHWAITE e PRIVES, 2006; SMEENK *et al.*, 2008).

Assim, a perda da função de p53, seja por mutação no gene *TP53* (mais frequente), ou mediante uma inativação funcional da própria proteína p53, por interação com proteínas virais ou celulares (comportando-se na forma equivalente a uma mutação do gene), determina um aumento da instabilidade genômica, que eleva a frequência de ampliações gênicas, rearranjos cromossômicos ou outros tipos de mutações. Como resultado desses processos pode ocorrer um acúmulo de danos genéticos que contribuem para a formação do tumor (BRAITHWAITE e PRIVES, 2006).

3. 5 DOMÍNIOS DA PROTEÍNA p53

A proteína p53 atua como um fator de transcrição tetramérico e cada monômero da proteína tem 393 aminoácidos organizados em domínios bem definidos. O domínio N-terminal é formado pelos primeiros 73 aminoácidos. Em seguida, encontra-se um domínio rico de prolinas, envolvido na interação proteína-proteína e na função pró-apoptótica da proteína p53. Na região central, encontra-se o domínio de ligação ao DNA, que compreende dos exons 5 ao 8, região onde são encontradas as maiorias das mutações no gene *TP53* associadas a tumores. Por fim, está localizada a região C-terminal com um domínio de oligodimerização, fundamental para a tetramerização da proteína p53. (FIGURA 1)

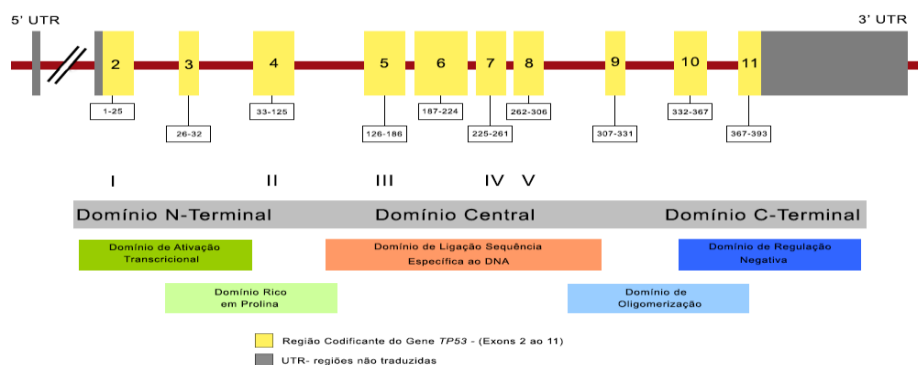


Figura 1- Representação esquemática de organização genômica do gene TP53 e dos diferentes domínios proteicos da proteína p53.

3.6 A MUTAÇÃO R337H TP53

A mutação R337H TP53 foi primeiramente descrita em 1998 em uma família da França, em uma região do gene TP53 em que poucas mutações germinativas foram descritas, fora da região de ligação ao DNA (BOUGEARD,2001).

No ano de 1999, Figueiredo e colaboradores, notaram uma alta incidência do Tumor de Córtex Adrenal (TCA) no sul do Brasil. Sabe-se hoje, que o TCA pediátrico ocorre em aproximadamente um caso para cada três milhões de indivíduos com menos de 15 anos de idade, na maioria dos países. Devido à alta incidência do TCA nesta região do país, iniciou-se uma busca por mutações que pudessem estar desenvolvendo esse tipo de câncer. A mutação R337H TP53, foi identificada por Ribeiro e colaboradores (2001), em pacientes pediátricos diagnosticados com TCA.

A mutação ocorre no exon 10 do gene TP53 e como resultado, é codificada uma histidina no lugar de arginina (R337H) no domínio de dimerização da proteína p53. A troca dos aminoácidos parece alterar pontes de hidrogênio entre os monômeros da proteína p53, desta forma, a proteína não pode realizar sua função como supressora de tumor (CURY, 2014). Ao contrário do que é visto na maioria das

mutações do gene *TP53*, a mutação R337H não ocorre na região de ligação ao DNA, e sim na região de oligodimerização da proteína p53.

A alta incidência da mutação R337H no sul do Brasil, deve-se a ocorrência de um evento de efeito fundador. Garritano e colaboradores (2009), realizaram um estudo detalhado do *locus* do gene *TP53*, e foi verificado que 12 pacientes não relacionados, diagnosticados com a mutação R337H apresentavam o mesmo haplótipo. Apesar dos diversos estudos realizados para se determinar a prevalência da R337H *TP53* no Brasil, ainda é controversa a sua origem, mas sugere-se que a mutação tenha se estabelecido na população, devido às atividades realizadas pelos tropeiros, nos séculos XVIII e XIX entre os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.

Um dos fatores que pode ter facilitado a persistência da mutação R337H *TP53* na população do Sul do Brasil, deve-se ao seu impacto relativamente limitado em crianças e adolescentes, quando comparado com outras mutações no *TP53*, associadas a LFS ou LFS-*like*. Este impacto leve pode ser consequência de propriedades moleculares incomuns da mutação. Estudos bioquímicos revelaram, que a troca de uma arginina por uma histidina no códon 337 do gene *TP53*, alteram a estrutura de oligodimerização da proteína p53, reduzindo sua afinidade ao DNA. A troca desses aminoácidos, resulta em um pequeno aumento do pH no interior da célula, de 7,5 para 8, alterando a estrutura conformacional da p53 (DiGIMMARINO *et al.*, 2002; LWIN *et al.*, 2007).

A especificidade de tecido da mutação R337H pode ser devida ao aumento do pH nas células adrenais durante o desenvolvimento da glândula adrenal, quando se observa uma elevação do pH intracelular. Este aumento seria responsável pelo bloqueio da oligodimerização da proteína p53. Esta hipótese é corroborada pelo restabelecimento da oligodimerização quando o pH se aproxima de 7,0 (DiGIMMARINO *et al.*, 2002)

Apesar do crescente número de estudos sobre a mutação R337H *TP53*, ainda não é bem estabelecida a relação entre a presença da mutação e as SLF e SLF *like*. Figueiredo e colaboradores (2007) postularam a hipótese de que a mutação tem uma especificidade órgão dependente e penetrância relativamente baixa (10%

durante a primeira década de vida) para o desenvolvimento de câncer, não considerando portanto, estes pacientes, como portadores da SLF ou SLF *like*. Em contrapartida, Achatz e colaboradores (2007), sugerem que a idade, sexo e espectro de tumores, observados em portadores da mutação R337H *TP53*, são semelhantes aos pacientes com SLF ou SLF *like*.

3.7 A MUTAÇÃO R337H *TP53* E O CÂNCER DE MAMA

O desenvolvimento de câncer de mama é visto em aproximadamente 30% das famílias LFS portadoras da mutação R337H *TP53*. A mutação parece estar relacionada com tumores mais agressivos de mama. Em estudos realizados por Assumpção e colaboradores (2008), tumores representativos de carcinoma ductal *in situ*, não apresentam a mutação, ao contrário dos carcinomas ductais invasivos. Entretanto, isso não é uma regra, já que mutações em *TP53* podem estar presentes em estágios precoces, particularmente em tumores agressivos, como é o caso dos mamários triplo-negativos (ausência de expressão de ER, PR e HER2), determinando a rápida progressão da doença a estágios mais avançados (OLIVER e HAINAUT, 2001).

Casos de câncer de mama associados com mutações germinativas no gene *TP53* parecem estar mais relacionados com tumores hormônio positivo e com amplificação do oncogene *HER2* (MASCIARI, 2012).

Custódio (2011) analisou 353 famílias de 461 recém-natos no Estado do Paraná, entre os anos de 2005 e 2010, e constatou que parentes do ramo familiar que segregava a mutação R337H *TP53* apresentavam um número 3,5 vezes maior de casos de câncer (n=550) do que aqueles que não segregavam (n=158). A autora observou também que em famílias que segregavam a mutação mas não tinham casos identificados de TCA, o tipo de câncer mais frequente na vida adulta era o de mama ($87/353=24,7\%$), seguido pelo de estômago e de outros tipos. Estas famílias apresentavam três ou mais casos de câncer, considerados como LFL de acordo com os critérios de Birch, 1994 (cf. CUSTÓDIO, 2011). Neste mesmo trabalho,

analisando 171.649 recém-natos no Estado do Paraná a autora observou 461 com a referida mutação, definindo a sua frequência em 0,27%.

A associação entre o tipo de mutação e o fenótipo clínico em câncer de mama tem sido objeto de estudo de vários trabalhos que procuraram estabelecer uma correlação entre a presença de mutações e a agressividade do tumor. Em geral, o tipo de mutação (dobramento da proteína, interação proteína-DNA) pode ser um indicador de tumores biologicamente mais agressivos (LAI *et al.*, 2004; MOURA-GALLO *et al.*, 2004).

Essas observações sugerem que a mutação R337H *TP53* possa ser relevante na tumorigênese mamária, tanto na sua origem quanto no seu desenvolvimento e agressividade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ABORDAGEM ÉTICA E EXPERIMENTAL

Este trabalho faz parte de um amplo projeto de pesquisa em Genética do Câncer, aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba / PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. O projeto específico foi aprovado em 6 de abril de 2013 pelo Comitê de Ética da Universidade Positivo, Curitiba, Paraná (Processo n. 09718912.8.0000.0093). Vem sendo desenvolvido de forma multidisciplinar no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, com a participação efetiva de oncologistas clínicos dos Hospitais Nossa Senhora das Graças e do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, ambos de Curitiba, Paraná .

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram disponibilizadas pelo Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e enviadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR. As amostras foram então processadas para retirada de vasos sanguíneos e material adiposo, e posteriormente armazenadas em freezer -80°C.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do protocolo de fenol-clorofórmio adaptado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética.

Primeiramente o tumor foi incubado com Proteinase K e deixado em banho-maria a 55°C por 18 horas. No dia seguinte era realizada a extração de DNA, utilizando dois banhos de fenol-clorofórmio e álcool absoluto para a precipitação do DNA. Posteriormente, o material era lavado em álcool 70% e eluído em 40ul de água ultra pura.

A quantificação do DNA foi realizada no equipamento Nanodrop 2000 através da absorbância medida em 260nm e 280nm (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 2001). A concentração média de DNA observada nas amostras foi de 350ng/ul, posteriormente foi feita a eluição dessa concentração para 20ng/uL.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Um fragmento de 268pb do exon 10 do gene TP53 foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores 5' -CAT GTT GCT TTT GTA CCG TC -3' (forward) e 5'-CTG CCT TCC TAG GTT GGA AA -3' (reverse), cedidos pelo Instituto Pelé Pequeno Príncipe.

A reação foi realizada em tubos individuais de 200 µl, utilizando o seguinte protocolo: tampão PCR 10x, 0,3 ul deTaq polimerase Invitrogen , 0,5 ul de cada iniciador-*primers- Forward e Reverse* (Invitrogen) (100pmol), 0,4 ul dNTP GE (10nmol) de cada, 0,45ul de MgCl₂ (50mM) e o 20ng/uL DNA molde, em um volume total de reação de 15µl.

A amplificação do DNA genômico seguiu a programação descrita no TABELA 1

Tabela 1- Programa de ciclagem PARA amplificação por PCR do DNA genômico do exon 10 do gene *TP53*. Fonte: A autora, 2014

Etapas do Ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	95 °	4min
30 ciclos:		
- Denaturação	95 °C	45 segundos
- Anelamento dos primers	64 °C	1 minuto
- Extensão	72 °C	45 segundos
Extensão Final	72 °C	10 min
Finalização	4 °C	

4.5 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

As enzimas de restrição clivam fragmentos de DNA dupla fita quando identifica sítios de restrição específicos. Os polimorfismos de sítios de restrição (RSPs, do inglês *Restriction Site Polymorphism*) resultam em alelos que possuem ou não um sítio de restrição específico e podem ser diferenciados pela digestão com a endonuclease de restrição que o reconhece. Os fragmentos resultantes possuem dois alelos correspondendo à presença ou à ausência desse sítio de restrição, gerando fragmentos cujos tamanhos são característicos dos dois alelos, podendo assim ser identificados (STRACHAN e READ, 2002).

A mutação existente na região amplificada foi identificado através da digestão desses fragmentos com a enzima HhaI, cujo sítio de restrição é a sequência GCG/C. Vinte microlitros do produto obtido na PCR foram incubados com 0,5ul da enzima HhaI a 37°C por 2 horas. A enzima é capaz de clivar o fragmento de 268 pb em dois fragmentos de 123 e 145 pb na ausência da mutação R337H *TP53*. Na presença da mutação, o sítio de restrição da enzima HhaI é perdido e o fragmento de 268 pb não é clivado (CUSTÓDIO, 2011).

4.6 ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO

A visualização dos fragmentos em forma de bandas foi realizada em gel de agarose a 3% corado com *gel red* (Biotium), onde cada banda corresponde a um grupo de moléculas do mesmo tamanho. Foram utilizados 7 ul do produto digerido para visualização no gel. As imagens dos géis foram capturadas pelo fotodocumentador *DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro* através do software *GelCaptureTM* e analisadas visualmente posteriormente.

5.0 RESULTADOS

Foram avaliadas 314 pacientes para a presença ou ausência da mutação R337H *TP53*, todas do sexo feminino e diagnosticadas com câncer de mama.

Pacientes que apresentam duas bandas de DNA visualizadas no gel, são consideradas selvagens, uma vez que o sítio de clivagem da enzima de restrição *HhaI* é mantido nesta condição. Pacientes que apresentam três bandas no gel são consideradas heterozigotas, e por fim, pacientes com apenas uma banda são homozigotas para a mutação.

Até o momento, entre as pacientes analisadas somente em uma (0,32%) há indicação de ser portadora desta mutação (FIGURA 2). Pela presença de três bandas, pode-se ainda inferir que a paciente é heterozigota para a mutação. Para confirmação desse resultado, devido ao aparecimento de bandas extras, a amostra da paciente será submetida ao sequenciamento de DNA. Esta paciente tinha 95 anos de idade, quando seu material chegou ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética no ano de 2001, é portadora de carcinoma ductal invasor de grau III e ausência de metástase no linfonodo axilar.

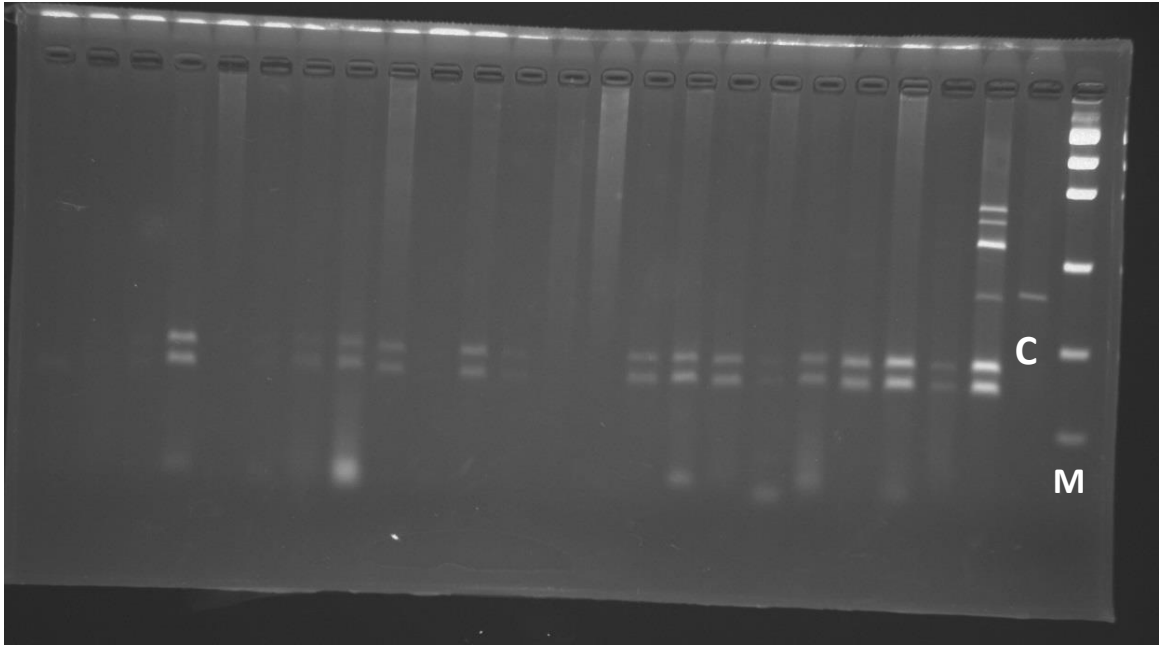


Figura 2- Gel de agarose exemplificando a genotipagem de nove amostras de pacientes.

Legenda: C, controle positivo para a mutação R337H. M, marcador de massa molecular.

Paralelamente à genotipagem pela técnica de PCR-RFLP, foi realizada a caracterização da amostra, uma vez que a escolha das pacientes foi feita ao acaso, para não interferir no resultado do trabalho. Das 314 pacientes analisadas, 90% foram diagnosticadas com Carcinoma Ductal Invasor, dado que corresponde ao encontrado na literatura (GRÁFICO 1).



Gráfico 1- Representação dos tipos de carcinomas encontrados na amostra analisada.

A idade média das pacientes analisadas foi de 54,12 anos \pm 4,76. As pacientes foram divididas de acordo com a idade em grupos pré (55 anos de idade ou menos) e pós-menopausa (acima de 55 anos de idade). Neste critério de separação, houve uma distribuição bastante semelhante entre os dois grupos (GRÁFICO 2).



Gráfico 2- Distribuição de acordo com a idade. Pacientes sem a informação da idade no laudo foram agrupadas.

As pacientes foram ainda agrupadas de acordo com a presença ou ausência de metástase no linfonodo axilar. A distribuição de acordo com este critério também foi bastante equivalente, podendo ser observada somente uma pequena fração maior das pacientes diagnosticadas com metástase no linfonodo axilar (GRÁFICO 3)

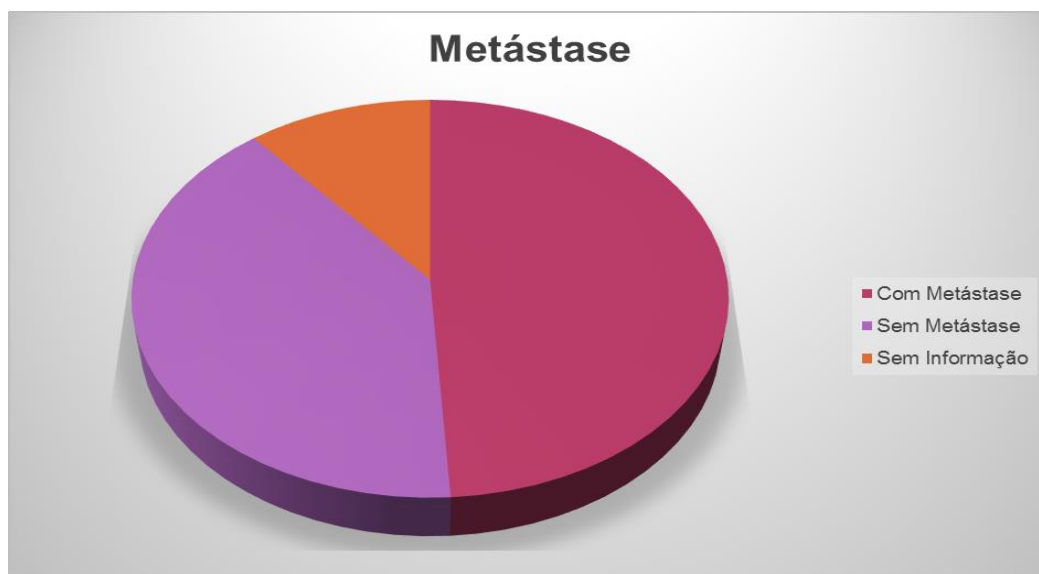


Gráfico 3- Distribuição das pacientes de acordo com a presença ou ausência de metástase no linfonodo axilar. Pacientes sem informação no laudo foram agrupadas

6.0 DISCUSSÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e é o mais frequente em mulheres, exceto casos de câncer de pele não melanoma. Representa uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais, mesmo com os avanços no estadiamento e nos tratamentos quimio/radioterápicos e cirúrgicos (ABDUL-RASOOL *et al.*, 2006). No Brasil, a cada ano, cerca de 30% dos novos casos de câncer são de mama (INCA, 2013).

A forma hereditária do câncer de mama representa cerca de 5-10% dos casos diagnosticados e podem ser explicados por mutações germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2*, *ATM*, *CHEK2* (KEAN, 2014). A presença de histórico familiar de câncer de mama, a manifestação precoce da doença, a bilateralidade e

características histopatológicas específicas são importantes fatores sugestivos para presença de mutações nesses genes.

Mutações germinativas no gene *TP53* estão associadas à Síndrome de Li Fraumeni e Síndrome de Li Fraumeni *like*. A LFS é caracterizada pelo aparecimento de tumores em idade precoce (antes dos 45 anos), principalmente sarcomas, tumores de mama, córtex adrenal e leucemias (NICHOLS,2001). Famílias que não se enquadram em todos os da LFS, são diagnosticadas com a Síndrome de Li-Fraumeni *like*, que tem como principal diferença a ausência de um probando diagnosticado com sarcoma em suas definições (BIRCH, 1994).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil foi identificada uma mutação germinativa no éxon 10 do gene *TP53*, a R337H. Esta mutação apresentava frequências elevadas nessas regiões, em consequência de um evento de efeito fundador para a mutação. Foi verificado, que 95% de pacientes diagnosticados com câncer de córtex adrenal, portadores da mutação R337H *TP53*, apresentavam o mesmo haplótipo para esse *locus* (PINTO, 2004). Estudos independentes estimaram entre 0,28-0,30% a prevalência da mutação R337H *TP53* na população geral da região Sul do Brasil (RIBEIRO, 2001; LATRONICO, 2001; ACHATZ, 2007).

No câncer de mama, cerca de 20-35% dos tumores apresentam mutações no gene *TP53* sendo que a maioria delas é de origem somática (LACROIX et al., 2006). No entanto, são frequentes mutações germinativas no *TP53* em indivíduos com a síndrome de Li-Fraumeni, na qual ocorrem diversos casos de câncer durante a infância ou adolescência, e que confere um risco aumentado para o câncer de mama (hereditário). O câncer de mama representa 28,6% dos casos de câncer em famílias portadoras da mutação R337H (ACHATZ, 2007), comparado com 27,2% e 27,8% em famílias com mutações germinativas no gene *TP53*, na América do Norte e no Oeste Europeu, respectivamente (IARC, 2012).

A associação entre o tipo de mutação e o fenótipo clínico em câncer de mama tem sido objeto de estudo de vários trabalhos que procuraram estabelecer uma correlação entre a presença de mutações e a agressividade do tumor. Em geral, o tipo de mutação (e sua consequência como alterações no dobramento da proteína,

na interação proteína-DNA) pode ser um indicador de tumores biologicamente mais agressivos (LAI *et al.*, 2004; MOURA-GALLO *et al.*, 2004).

De acordo com a OMS, os estudos populacionais são de grande importância para a identificação de fatores etiológicos e populações susceptíveis ao desenvolvimento tumoral, subsidiando o estabelecimento de estratégias de prevenção mais eficientes.

Muitos esforços para a melhoria no controle do câncer de mama, tanto no âmbito preventivo e diagnóstico como no terapêutico têm sido realizados. No entanto, os mesmos não têm sido suficientes para que se obtenham os resultados esperados, necessitando o desenvolvimento e utilização de procedimentos metodológicos que forneçam conhecimentos mais efetivos, principalmente sobre a etiologia da doença.

A mutação R337H *TP53*, descrita em frequências elevadas em populações do Sul do Brasil, comparativamente à de outras regiões e países, é associada ao câncer de mama (ASSUMPCÃO *et al.*, 2008) e com prognóstico desfavorável (cf. CUSTÓDIO, 2011). Assim, a estimativa da frequência desta mutação em pacientes portadoras de câncer de mama pode se constituir num potencial auxiliar preventivo, diagnóstico, terapêutico e prognóstico.

7.0 CONCLUSÃO

Este estudo teve por objetivo avaliar a frequência da mutação R337H *TP53* em pacientes portadoras de carcinoma mamário esporádico para verificar se esta frequência está aumentada em relação à população geral, estimada em 0,3%, desde que os carcinomas mamários se constituem no segundo tipo de tumor mais frequente em famílias portadoras desta mutação. Apesar de ser um estudo de longa duração, em que se pretende genotipar 3000 mulheres, até o presente momento concluímos que a frequência é a mesma da população geral, desde que foi identificada em uma paciente de 314 genotipadas (0,32%).

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RASOOL, S. et al., An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *Journal of Clinical Pathology*. v.59, p.289-297. 2006.

ACHATZ, MI. et al., The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumenilike syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett*. v.245, p.96–102. 2007.

ASSUMPÇÃO, JG. et al., Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*. v.8, p.357. 2008.

BERTHEAU, P. et al., TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathobiology*. v.75, p.132-139. 2008.

BOUGEARD, G. et al., Detection of 11 germline inactivating TP53 mutations and absence of TP63 and HCHK2 mutations in 17 French families with Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. v. 38(4), p.253-7. 2001

BRAITHWAITE, AW.; PRIVES, CL. P53: More Research and More Questions. *Cell Death and Differentiation*. v.13(6), p.877-80. 2006

BIRCH, JM. et al., Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li–Fraumeni families. *Cancer Res*. v.54, p.1298– 1304. 1994.

CLARK, AS.; DOMCHEK, SM. Clinical management of hereditary breast cancer syndromes. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia*. v.16(1), p.17–25. 2011.

CURY, N. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. v.12, p.8. 2014.

CUSTÓDIO, G. Rastreamento da mutação R337H TP53, diagnóstico precoce do tumor de córtex adrenal e histórico de câncer em famílias do estado do Paraná. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. 2011.

DIGIAMMARINO, EL.; LEE, AS.; CADWELL, C.; et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*. v.9, p.12-6. 2002.

DUROCHER, F. et al., Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet*. v.33, p.814–819. 1996.

FIGUEIREDO, BC.; STRATAKIS, CA.; SANDRINI, R.; et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. v.84, p.1116-21. 1999.

FIGUEIREDO, BC.; GALINDO, CR.; RIBEIRO, RC. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome *Cancer Letters*. v.247, p.353–355. 2007.

FINLAY, CA.; HINDS, PW.; LEVINE, AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. v.57(7), p.1083-1093. 1989.

FUNK, W. D. et al. A transcriptionally active DNA binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol, Dallas*. v.12, n.6, p.2866-2871.1992.

GARRITANO, S. et al., Detailed Haplotype Analysis at the TP53 Locus in p.R337H Mutation Carriers in the Population of Southern Brazil: Evidence for a Founder Effect. *HUMAN MUTATION*. v. 31,nº2, p.143–150. 2010.

International Agency for Research on Cancer (IARC) Database (2012) Available: <<http://p53.iarc.fr/p53Sequences.aspx>>. Accessed July 1, 2012.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (2014). Estimativa 2014: incidência de Câncer no Brasil. <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acessado em julho de 2014.

JACKS, T. et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol, Cambridge*. v.4, n.1, p.1-7.1994.

JEMAL, A. et al., Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. v.60, nº5, p.1-24, 2010.

KEAN, S. Breast cancer. The 'other' breast cancer genes. *Science*. v.28, p.343(6178). 2014.

LACROIX, M.; TOILLON, RA.; LECLERCQ, G. P53 and Breast Cancer, an Update. *Endocrine-related Cancer*. v.13(2), p.293-325. 2006.

LAI, H. et al. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Research and Treatment*. v.83(1), p.57-66. 2004.

LEVINE, AJ. p53 the cellular gatekeeper for growth division. *Cell*. v.88(3), p.323-331. 1997.

LI, FP.; FRAUMENI, JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*. v.43, p.1365-73. 1969.

LI, FP. et al., A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* v.48, p.5358–5362.1988.

LWIN, TZ.; DURANT, JJ.; BASHFORD, D. A fluid salt-bridging cluster and the stabilization of p53. *J Mol Biol*. v.373, p.1334–1347. 2007.

MARCEL, V.; HAINAUT, P. P53 Isoforms - a Conspiracy To Kidnap P53 Tumor Suppressor Activity? *Cellular and molecular life sciences*. v.66(3), p.391-406. 2009.

MARIGO, C.; MULLER, H.; DAVIES, JN. Survey of cancer in children admitted to Brazilian charity hospital. *Journal of the National Cancer Institute*. v.43, p.1231-1240. 1969.

MASCIARI, S. et al., Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: A Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat*. v.133, p.1125–30. 2012.

MCBRIDE, OW.; MERRY, D.; GIVOL, D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. v.83, p.130-134.1986.

MOURA-GALLO, CV. et al., Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Epidemiologia. v.7(2), p.167-175. 2004.

NICHOLS, KE1. et al., Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. v.10(2), p.83-7.2001.

NUSSBAUM, R. L. Genética Médica. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis. Seminars in Cancer Biology. v.11(5), p.353-60. 2001.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a001008. 2010.

OKOROKOV, AL. et al., The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. The European Molecular Biology Organization Journal Journal. v. 25(21), p.5191-200. 2006.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potencial Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist*. v. 9, p. 361-377. 2004.

PLEVRITIS, SK. et al., Cost-effectiveness of screening BRCA1/2 mutation carriers with breast magneticresonance imaging. *JAMA*. v.295(20), p.2374–2384. 2006.

PIANOVSKI, MA. et al., Mortality rate of adrenicotical tumors in children under 15 year of age in Curitiba, Brazil. *Pediatric Blood Cancer*. v.47, p.56-60. 2006.

PINTO, EM1. et al., Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. v.48(5), p.647-50. 2004.

READ, A.; DONNAI, D. *Genética Clínica: Uma nova Abordagem*. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 321, 2008.

RIBEIRO, RC. et al., An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.98, p.9330–9335. 2001.

ROSSNER, PJ. et al., Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *Cell*. v.13(9B), p.3847-3857. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, EF.; MANIATIS, T. *Acta Biotechnologica Molecular cloning-A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001.

SMEENK, L. et al., Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Research*. v.36(11), p.3639-54. 2008.

STRACHAN, T.; READ, AP. *Genética Molecular Humana*. Artmed. 2002.

SUTCLIFFE, JE.; BREHM, A. Of flies and men; p53, a tumour suppressor. *FEBS letters*. v.567(1), p.86-91. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Fevereiro de 2014.

