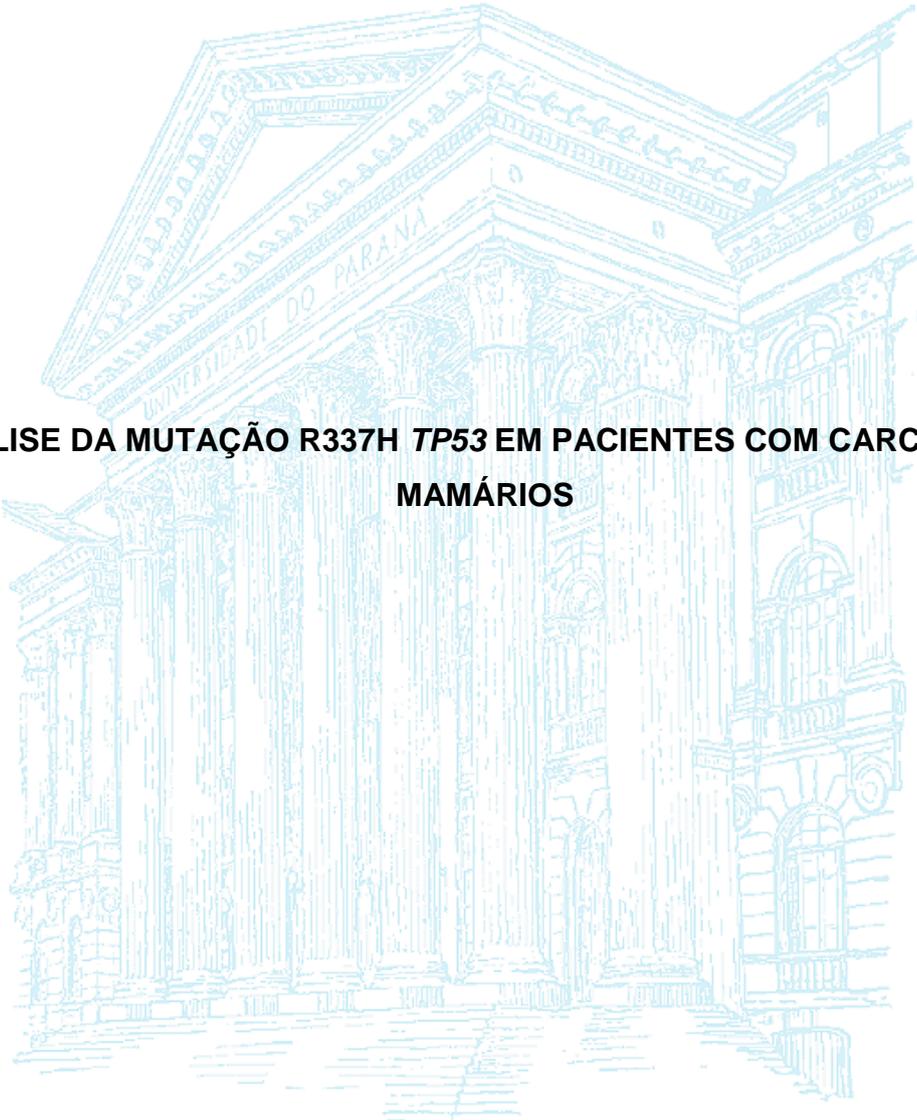


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MATHIAS



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

CURITIBA

2016

CAROLINA MATHIAS

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientador: Prof^a. Dr. Iglenir João Cavalli

Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Enilze M. S. F.
Ribeiro

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Mathias, Carolina

Análise da mutação R337H pacientes com carcinomas mamários. /
Carolina Mathias. – Curitiba, 2016.
93 f. ; 30cm.

Orientador: Iglénir João Cavalli

Coorientador: Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer 2. Instabilidade genômica I. Título II. Cavalli,
Iglénir João III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.99249



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de CAROLINA MATHIAS, intitulada: “Análise da mutação R337H TP53 em pacientes portadoras de carcinomas mamários”, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 22 de novembro de 2016

Dr. Igenir João Cavalli
Dép. Genética/UFPR – presidente

Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo
Instituto Pelé-Pequeno Príncipe

Dr. Cícero de Andrade Urban
Universidade Positivo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e à Profa.Dra. Enilze. M. S F.Ribeiro por todos esses anos de orientação, pela paciência, por tudo o que me ensinaram nesse período que contribuiu de forma grandiosa para minha formação científica.

Aos colaboradores: Professores Drs., Ana Paula Sebastião, Bonald Figueiredo, Cícero de Andrade Urban, Emerson Soares, Luciane Cavalli e Rubens Silveira Lima, que participaram de forma ativa para que esse trabalho fosse concluído.

Ao Prof.Dr. Emanuel Maltempi de Souza, que possibilitou a realização do sequenciamento das amostras no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Aos membros da banca examinadora, Professores Drs. Bonald Figueiredo e Cícero de Andrade Urban e Valéria Maria Munoz Sperandio Roxo por aceitarem analisar este trabalho.

Aos membros da banca de acompanhamento, Prof.Dra. Danielle Malheiros e Prof.Dra.Valéria Roxo, por todas as contribuições que fizeram neste trabalho ao longo destes 2 anos.

A todas as pacientes envolvidas neste estudo

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

À CAPES, pelo apoio financeiro

Em especial...

Aos meus pais, *José Luiz e Silvia*, por sempre acreditarem em mim e no meu sonho, e por sempre terem feito de tudo para que eu conseguisse realiza-lo. Muito obrigada por tudo.

À minha avó, *Maria do Carmo*, pela amizade, pelo amor e por sempre cuidar de mim.

À minha tia, *Ciça*, por ter sido mais que uma tia ao longo desses anos, pela amizade, pelo companheirismo.

As minhas queridas amigas, *Adriana, Marcela, Renata, Tayana*, por todos esses anos de amizade, e por sempre me apoiarem nas decisões da minha vida.

À Prof. Dra. Roseli Wassem, pela amizade e por tudo em que me ajudou desde a iniciação científica, com certeza grande parte dessa conquista devo a ela.

À querida *Ana Luiza Mattana*, pelas conversas diárias, pela amizade e por ser mais que uma técnica de laboratório, por ser amiga, mãe.

Aos meus eternos amigos *Heloisa, Simone e Guilherme*, por tudo o que vocês representam na minha vida.

À *Carol*, minha maior companheira ao longo destes dois anos, que me aguentou, que acreditou em mim, e que me transformou em uma pessoa melhor.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo mais comum dos casos de câncer diagnosticados em adultos com mutações germinativas no gene *TP53*, representando 27% de todos os tipos de câncer que apresentam mutação nesse gene. O estudo do gene supressor de tumor *TP53* possibilitou a 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 tetramerização da proteína p53. Esta mutação ocorre em 95% dos pacientes pediátricos do Sul do Brasil portadores de Tumor de Córtex Adrenal (TCA), sendo de 0,27% a sua frequência populacional. Em uma análise de 171.649 recém-nascidos do Estado do Paraná, as famílias de indivíduos com a mutação R337H *TP53* foram analisadas, sendo observado que o câncer de mama foi o tipo mais frequente de neoplasia encontrada nos adultos, correspondendo a 14,55% dos casos. O objetivo principal deste trabalho foi verificar, através da técnica de discriminação alélica pelo sistema TaqMan e Sequenciamento de Sanger, a frequência da mutação R337H *TP53* em uma amostra de DNA tumoral de 700 pacientes portadoras de carcinomas mamários atendidas nos Hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas de Curitiba, PR, e analisar a instabilidade genômica, por *array*-CGH, nas pacientes com (n=5) e sem (n=9) a mutação R337H *TP53*. Das 700 pacientes, onze eram heterozigotas para a mutação estudada, com frequência genotípica de 0,0157 e alélica de 0,0079. A frequência genotípica observada na amostra analisada foi demonstrada ser 5,93 vezes maior do que a descrita previamente (0,27%), em uma amostra de 171.649 recém-nascidos do Estado do Paraná, indicando a relevância desta mutação na carcinogênese mamária. Após a comparação dos dados clínicos histopatológicos das pacientes com e sem a mutação, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade dos dois grupos de pacientes ($t=1,97$; $P<0,05$), tendo as pacientes com a mutação uma média de idade ao diagnóstico inferior ($46,54 \pm 14,53$ anos) quando comparado com o grupo sem a mutação ($55,47 \pm 14,96$ anos). Os resultados de análise de a-CGH no DNA das pacientes estudadas demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias das alterações cromossômicas (ganhos, perdas e total) observadas nos dois grupos de pacientes, indicando que a mutação R337H *TP53* não contribui significativamente para a instabilidade genômica nas pacientes com câncer de mama portadoras dessa mutação.

Palavras-chave: Câncer de mama. *TP53*. R337H. Genotipagem. Instabilidade genômica

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer type diagnosed in adults with germline mutations in the *TP53* gene, accounting for 27% of all of those cancers. The study of *TP53* tumor suppressor gene allowed the identification of R337H *TP53* mutation in exon 10, resulting in an arginine-to-histidine amino acid substitution in the dimerization domain of the p53 protein. This mutation occurs in 95% of pediatric patients with adrenocortical tumors (ACT) in South of Brazil, reaching a frequency of 0.27% in this population. In a populational study involving 171.649 newborns of Paraná state, families of individuals carrying the R337H *TP53* mutation were analyzed, and breast cancer was the most common type of malignancy found in this cohort (14.55%) The aim of this study was to verify, through genotyping techniques as TaqMan assay and Sanger Sequencing, the frequency of the R337H *TP53* mutation in a cohort of 700 patients with breast carcinoma collected in two Institutions (Hospital Nossa Senhora das Graças and Hospital de Clínicas) from Curitiba, Paraná, and to analyze genomic instability, using array-CGH, in patients with (n=5) or without the R337H *TP53* mutation (n=9). In this cohort, eleven patients were identified as heterozygous for the R337H *TP53* mutation giving a genotypic frequency of 0.0157 and an allelic frequency of 0.0079. The genotypic frequency observed in this study was 5.93 times higher than the one described previously in a sample of 171.649 newborns of Paraná, implying the relevance of this mutation in breast carcinogenesis. After comparing the histopathological and clinical data of patients with and without the mutation, it was observed a statistically significant difference between the mean age of both groups ($t = 1.97$, $P < 0.05$), where patients with the mutation exhibit a lower average age (46.54 ± 14.53 years) at diagnosis when compared with the group without the mutation (55.47 ± 14.96 years). CGH analysis reveal no statistically significant difference between the mean changes (chromosome gains, losses and total) observed in both groups of patients, indicating that the mutation R337H *TP53* does not significantly contribute to chromosomal instability in patients with breast cancer.

Keywords: Breast cancer; R337H, *TP53*, Genotyping, Genomic Instability

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- DIVERSIFICAÇÃO CLONAL REPRESENTADA POR ALTAS TAXAS DE MUTAÇÃO.	4
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO GENE TP53. FONTE: O AUTOR.....	13
FIGURA 3- BOXPLOT DE DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES DAS PACIENTES COM E SEM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	27
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM POR SONDA DE HIDRÓLISE TAQMAN EM PACIENTE UMA HOMOZIGOTA SELVAGEM PARA A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	31
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM POR SONDA DE HIDRÓLISE TAQMAN EM UMA PACIENTE HETEROZIGOTA PARA A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	311
FIGURA 6 - PERFIL GENÔMICO DA PACIENTE COM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i> Nº 5	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ETAPAS DA REAÇÃO DE PCR REALIZADAS NO APARELHO VIIA™ 7 REAL TIME PCR.....	32
TABELA 2: CICLAGEM DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO REALIZADA NO APARELHO VERITI™ APPLIED BIOSYSTEMS.....	33
TABELA 3: PARÂMETROS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS CASOS ESTUDADOS NOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES.....	38
TABELA 4: FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CASO.....	43
TABELA 5: FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CASO.....	45
TABELA 6: FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CROMOSSOMO.....	47
TABELA 7: FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CROMOSSOMO.....	49
TABELA 8: MÉDIA DE GANHOS (n=144 e 150) E PERDAS (n=86 e 54) CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH, POR CASO E POR CROMOSSOMO, NAS PACIENTES COM E SEM A MUTAÇÃO R337H TP53, RESPECTIVAMENTE.....	51

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES (APÊNDICE)

APÊNDICE 1: INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	82
APÊNDICE 2: INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	83
APÊNDICE 3: ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR ARRAY-CGH, NAS CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	85
APÊNDICE 4: ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR ARRAY-CGH, NAS NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRX – Síndrome alfa talassemia/ retardo mental ligada ao X

CGH - Hibridização genômica comparativa, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*

CK – Citoqueratina

CNV – Variação do número de cópias, do inglês *Copy Number Variation*

dNTP – Desoxinucleotídeo tri-fosfato

ddNTP – Dideoxinucleotídeos tri-fosfato

ddGTP – Dideoxiguanosina tri-fosfato

ddATP – Dideoxiadenosina tri-fosfato

ddCTP – Dideoxicitosina tri-fosfato

ddTTP – Dideoxitimidina tri-fosfato

EGFR – Receptor de crescimento epidermal, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERBB2 – Proteína tirosina cinase Erbb2, do inglês *ErbB2 Receptor Tyrosine Kinase 2*

et al. – E colaboradores, do latim *et alii*

EXO I – Exonuclease I

FISH: Hibridização molecular de uma seqüência de DNA marcada por fluorescência, do inglês *Fluorescence in situ hybridization*

G245 – Resíduo de glicina do códon 245

GOF – Ganho de função, do inglês *Gain of Function*

HAPMAP – Organização internacional que desenvolveu um mapa de haplótipo do genoma humano, para descrever os padrões comuns de variação genética humana.

HOTSPOT – Ponto de acesso

IARC – *International Agency for the Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LOCI – Local em um cromossomo onde está localizado um gene ou marcador genético

LOH – Perda de heterozigose, do inglês *loss of heterozygosity*

MDM2 – Duplo minuto homólogo humano de camundongo 2

MDM4 – Duplo minuto homólogo humano de camundongo 4

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNAs

n – Tamanho amostral

NIB – Tampão não iônico, do inglês *Non ionic buffer*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH- Potencial Hidrogeniônico

PR – Paraná

R172H – Mudança no aminoácido arginina (R) para histidina (H) no códon 172

R175 – Resíduo de arginina (R) no códon 175

R248 – Resíduo de arginina (R) no códon 248

R337H – Mudança do aminoácido arginina (R) para histidina (H) no códon 337

ras – Família de oncogenes Ras

RE – Receptor de estrogênio

RP- Receptor de progesterona

RS – Rio Grande do Sul

RSL – Revisão sistemática da literatura

SAP- Fosfatase alcalina de camarão, do inglês Shrimp Alkaline Phosphatase

SED- Sem evidência de doença

SLF – Síndrome de Li Fraumeni

SLF *like*- Síndrome de Li Fraumeni *like*

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

SP – São Paulo

SPIN – Centrifugação rápida

TAG SNP – SNP representativo de uma região com alto nível de desequilíbrio de ligação

t_c = valor de t crítico

TCA- Tumor de córtex adrenal

TEM – Transição epitelial mesenquimal

TP53 – Proteína supressora de tumores (“Guardião do genoma”), do inglês Tumor protein 53

UC – Última consulta

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VCD- Viva com a doença

WT- gene ou proteína selvagem, do inglês *Wild-type*

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

mM	milimolar
μ l	microlítros
ng	nanogramas
pb	pares de bases

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 O Processo de Carcinogênese.....	3
2.2 O Câncer de Mama	4
2.2.1 Epidemiologia.....	4
2.2.2 Genética do Câncer de Mama.....	5
2.2.3 Classificação do Câncer de Mama	8
3. O gene TP53.....	12
3.1 A Mutação R337H <i>TP53</i> em Linhagem Germinativa	18
3.1.2 A Mutação R337H <i>TP53</i> e o Câncer de Mama	21
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo Geral.....	25
4.2 Objetivos Específicos	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Obtenção das Amostras	26
5.2 Caracterização da Amostra.....	26
5.3 Extração e Quantificação do DNA	28
5.4 Genotipagem da Mutação R337H <i>TP53</i>	29
5.5 Sequenciamento pelo Método de Sanger.....	32
5.6 array-CGH.....	34
5.7 Obtenção e análise das imagens	35
5.8 Análise Estatística	35
5.9 Aspectos Éticos.....	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Frequências Genotípica e Alélica.....	37
6.2 Associação com os parâmetros clínico-histopatológicos	37
6.2.1 Tamanho do Tumor.....	39
6.2.2 Grau do Tumor.....	40
6.2.3 Estágio do Tumor	40
6.2.4 Metástase	40
6.2.5 Expressão do Receptor de Estrogênio	41
6.2.6 Expressão do Receptor de Progesterona.....	41
6.2.7 Expressão da Proteína HER2	41
6.2.8 Expressão de Ki67	41

6.2.9 Evolução Clínica	41
6.3 array-CGH.....	43
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICES.....	81

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum e a principal causa de morte entre as mulheres. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados para os anos de 2016 e 2017 o diagnóstico de 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil. O crescente número de casos diagnosticados desta neoplasia no Brasil e no mundo, caracteriza o câncer de mama como um problema de saúde pública, que exige a superação de barreiras físicas, sociais, econômicas e psicológicas. Ampliar os conhecimentos sobre a sua etiologia, causas, desenvolver tratamentos e meios de diagnóstico precoce efetivos são prioridades da oncologia.

O aumento da incidência do câncer de mama pelo mundo pode ser associado a diversos fatores, entre eles: fatores ambientais, como estilo de vida, e fatores genéticos, de alta e baixa penetrância (INCA, 2016).

No que se refere aos fatores genéticos associados com o desenvolvimento do câncer de mama, os genes supressores de tumor são responsáveis por controlar etapas determinantes do processo de carcinogênese, como sistema de reparo, mecanismos de apoptose e manutenção da integridade do genoma. A inativação desses genes, impede que estes processos sejam realizados da forma correta (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Um dos principais genes supressores de tumor relacionado com a carcinogênese, é o *TP53*. Estima-se que 25% dos casos de câncer de mama apresentem mutações no gene *TP53*.

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 na posição 337 (R337H), no exon 10 do gene *TP53*, no domínio de tetramerização da proteína p53 (RIBEIRO *et al.*, 2001). A frequência da mutação R337H *TP53* foi observada em amostras da população dos Estados do Paraná, e Rio Grande do Sul aproximadamente, 1 a cada 300 indivíduos da população geral (PIOVEZAN, 2006; PALMERO *et al.*, 2008; CUSTÓDIO *et al.*, 2013).

A mutação R337H *TP53* foi inicialmente descrita sendo tecido específica por sua associação com tumores do córtex adrenal (RIBEIRO, SANDRINI *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2006) porém, a partir de estudos envolvendo famílias

portadoras da mutação R337H *TP53*, ela foi associada com outros tipos de neoplasias, como: câncer de mama (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; ACHATZ *et al.*, 2007; Assumpção *et al.*, 2008; CUSTÓDIO, 2011; GOMES *et al.*, 2012), câncer de estômago (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; CUSTÓDIO, 2011), carcinoma de plexo coroide (CUSTÓDIO, 2011, SEIDINGER *et al.*, 2011), câncer de cérebro (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; CUSTÓDIO, 2011), neuroblastoma (SEIDINGER *et al.*, 2015), osteossarcoma (SEIDINGER *et al.*, 2011), câncer de próstata (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), câncer de pulmão (FIGUEIREDO *et al.*, 2006) e de fígado (FIGUEIREDO *et al.*, 2006)

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a frequência da mutação R337H *TP53* em pacientes diagnosticadas com câncer de mama atendidas nos Hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas, da cidade de Curitiba, Paraná, através de Genotipagem por Sonda de Hidrólise TaqMan e Sequenciamento de Sanger; comparar os resultados obtidos com os dados clínicos histopatológicos das pacientes identificadas com e sem a mutação R337H *TP53* e analisar a instabilidade genômica de algumas pacientes com e sem a mutação através do método de *array-CGH*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Processo de Carcinogênese

O câncer é considerado como um conjunto heterogêneo de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado das células, que invadem órgãos e tecidos. A disseminação destas células pode alcançar regiões distantes daquela que é considerada como primária, processo denominado metástase.

A carcinogênese é um processo biológico dinâmico com a proliferação celular de diversos tipos de células que formam o tumor. Durante o processo de progressão, as células do tumor passam por alterações fenotípicas, como por exemplo, a diferenciação celular, ativação da resposta imune durante um processo inflamatório e a transição epitelial mesenquimal (TEM). Essas mudanças fenotípicas são impulsionadas por alterações no perfil de expressão de genes. Por exemplo, em resposta a um sinal que promove a diferenciação celular, uma população de células imaturas progenitoras expressam proteínas que estão relacionadas com o processo de diferenciação celular. Para que estas proteínas possam ser expressas uma rede de genes regulatórios atuam para coordenar a alteração de expressão dos genes que as codificam (ZHOU *et al.*, 2014).

A transformação das células progenitoras em células potencialmente malignas, através de alterações de expressão de alguns genes, pode ser exemplificada de acordo com o modelo darwiniano. As células que compõe o tumor, são as unidades de seleção, que competem entre si, em uma população de células. Eventos como mutações aleatórias, ocorrendo no tumor primário, podem proporcionar uma vantagem adaptativa às células com maior potencial maligno (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

O modelo mais aceito para explicar a progressão tumoral é complexo e apresenta variáveis a serem consideradas no que se refere à seleção darwiniana (FIGURA 1). Neste modelo, o genoma das células se torna cada vez mais instável. Enquanto isto ocorre, a taxa de geração de novos alelos pode exceder a taxa pela qual a seleção darwiniana elimina os clones celulares menos adequados. Desta forma, a massa tumoral é formada por um grande número de setores distintos, cada um dominado por um subclone geneticamente diferente (WEINBERG, 2008).

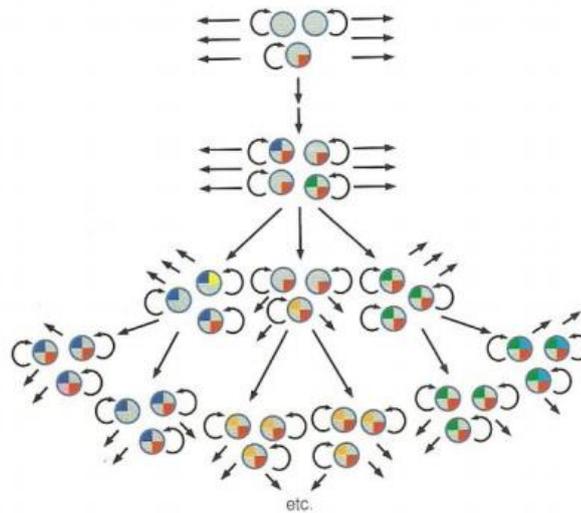


FIGURA 1- DIVERSIFICAÇÃO CLONAL REPRESENTADA POR ALTAS TAXAS DE MUTAÇÃO. Neste diagrama somente as células tronco tumorais estão representadas e, a partir delas se originam novos subclones. A progressão tumoral resulta em células com genomas altamente instáveis, aumentando por consequência a taxa de mutação. Fonte: Weinberg, 2008

De acordo com a Teoria Monoclonal do câncer, proposta por Nowel (1976), os tumores são originários de uma única célula que adquire várias mutações e potencial proliferativo ilimitado. Já a Teoria Policlonal sugere que múltiplas células adquirem potencial maligno, através de várias mutações, e se tornam precursoras de diversas subpopulações, geneticamente distintas, dentro de uma massa tumoral. Experimentos realizados para avaliar a clonalidade das células tumorais, indicam que muitos tumores são compostos por descendentes de uma única célula que ultrapassou a normalidade para a malignidade, porém observa-se que o processo de tumorigênese é bastante complexo (WEINBERG,2008). Neste contexto, deve-se considerar também as alterações epigenéticas, de microambiente, e de expressão de miRNAs na carcinogênese mamária (POLYAK,2007; BAYLIN & JONES, 2011).

2.2 O Câncer de Mama

2.2.1 Epidemiologia

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para os anos de 2016 e 2017 o diagnóstico de 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer é o mais incidente em mulheres nas diferentes regiões do país: Sul (74,30/100mil); Sudeste (68,08/100mil);

Centro-Oeste (55,87/100mil), Nordeste (38,74/100mil) e Norte (22,26/100mil). No que se refere à taxa de mortalidade devido ao câncer de mama, observa-se um crescente aumento no país. No ano de 1979, correspondia a 1,15% do total de óbitos em mulheres, chegando a 2,72% no ano de 2013 e a 2,75% em 2014 (INCA, 2016).

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 procedimento que detecta, em média, de 80-90% dos cânceres de mama em mulheres assintomáticas (JEMAL *et al.*, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (2002) indica que a assistência promovida por uma equipe multidisciplinar no âmbito dos cuidados paliativos, deve ser também disponibilizada as pacientes que não apresentam mais resposta ao tratamento curativo, proporcionando uma melhor qualidade de vida para a paciente e seus familiares. Além disto, é necessário que se criem novos programas de rastreamento para o câncer de mama, em países com baixo desenvolvimento socioeconômico, o que auxiliaria a reverter o quadro de mortalidade local e global causado pela doença.

2.2.2 Genética do Câncer de Mama

O câncer de mama compreende 23% de todos os casos de câncer diagnosticados no mundo (JEMAL *et al.*, 2011). Entre os principais fatores de risco associados com o desenvolvimento do câncer de mama, o mais importante deles é a idade da paciente ao diagnóstico, seguido pelo histórico familiar positivo para a doença (ROSMAWATI, 2010). Esta neoplasia apresenta uma grande heterogeneidade em suas características morfológicas, de sobrevida, de subtipos e genéticas (AL-TAMIMI *et al.*, 2010). A heterogeneidade do câncer de mama é observada a partir de estudos de comparação do genoma das células. Verifica-se que alguns genes aparecem frequentemente mutados, enquanto outros estão mutados em uma frequência menor (STHEPHENS *et al.*, 2009).

Estima-se que entre 5-10% dos casos de câncer de mama em mulheres estejam relacionados com a susceptibilidade hereditária devido à mutações dominantes em genes autossômicos associados ao câncer de mama hereditário, como: *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN* (NUSSBAUM *et al.*, 2007). Entre esses

casos de cânceres hereditários, 25-40% estão relacionados com a herança de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que explica em um risco aumentado de 50-80% para o desenvolvimento de câncer de mama e de ovário (HAMILTON *et al.*, 2008).

O desenvolvimento do câncer de mama é consequência de uma variedade de alterações genéticas em células normais. Estas alterações não são restritas às células que irão dar origem ao tumor. São observadas também alterações genéticas nas células que interagem com o tumor, como as do sistema imune, do sistema vascular e do estroma (BALMAIN *et al.*, 2003). As células que irão formar o tumor são denominadas “células tronco tumorais”. Estas células apresentam características semelhantes às células tronco normais, porém alterações genéticas nas mesmas, conferem uma maior capacidade de proliferação, de invasão e metástase (TANG, 2012).

As alterações genéticas encontradas em células de tumores mamários, podem ser classificadas em duas categorias funcionais principais: ganho de função em proto-oncogenes e perda de função em genes supressores de tumor.

O ganho de função em proto-oncogenes, resulta na sua transformação em oncogenes. A ativação dos proto-oncogenes em oncogenes pode acontecer de várias formas, como: translocações cromossômicas, mutações de ponto, ampliações gênicas ou superexpressão do gene. Como exemplos destes mecanismos pode-se citar a amplificação do gene *ERBB2* (frequentemente denominado de *HER2*), observado em 20% dos casos de câncer de mama, a ativação do oncogene *Ras* através de mutações de ponto, mecanismo comumente observado em câncer de pulmão, pâncreas e colorretal (WEINBERG, 2008) e o cromossomo Philadelphia (NOWELL & HUNGERFORD, 1960), observado principalmente na Leucemia Mielóide Crônica, resultante da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, t(9;22) (q34;q11), (ROWLEY, 1973).

Oncogenes codificam as oncoproteínas, variantes das proteínas normais, que apresentam a capacidade de interferir no ciclo celular de diversas maneiras: interagindo com receptores de crescimento fora da célula, atuando em receptores na superfície celular, emitindo sinais da membrana celular para o núcleo e, ainda, atuando diretamente no núcleo da célula (WEINBERG, 2008). De acordo com

Nussbaum e colaboradores (2007), os oncogenes *ERBB2*, *PI3KCA*, *MYC*, *CCND1* são os que principalmente aparecem desregulados no câncer de mama.

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos do crescimento celular, ativam o sistema de reparo e o mecanismo de apoptose, codificando proteínas, desta forma, responsáveis pela manutenção da integridade do genoma (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Vários genes supressores de tumor foram identificados com alterações em diversos tipos de neoplasias, entre eles: *TP53*, *RB1*, *MLH1*, *MSH2*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2* e *APC* (KOPNIN, 2000).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas responsáveis por impedir a progressão do ciclo celular, quando há danos no DNA (OSBORNE *et al.*, 2004). A inativação destes genes, impede que a célula regule os pontos de checagem, resultando na proliferação celular ilimitada.

Em 1971, Alfred Knudson formulou a Hipótese dos Dois Eventos de Mutação para explicar a atuação dos genes supressores de tumor: Em um dos alelos desses genes, ocorre um evento de mutação e o outro alelo é perdido por um segundo evento. A eliminação do segundo alelo pode estar associada à deleção intersticial, recombinação mitótica, não disjunção dos cromossomos durante a divisão celular, perda de heterozigose (LOH) ou silenciamento epigenético através de metilação do promotor que impede sua expressão (WEINBERG, 2008).

Genes supressores de tumor não são considerados com frequência como auxiliares do diagnóstico, com exceção dos genes de susceptibilidade herdados geneticamente. Da mesma forma, abordagens terapêuticas que objetivam recuperar a função do gene supressor de tumor mutado foram frustradas devido aos obstáculos técnicos encontrados na reposição do alelo perdido (OSBORNE *et al.*, 2004).

Alterações epigenéticas também são relevantes para o desenvolvimento do câncer de mama. A epigenética pode ser definida como modificações no padrão de expressão de genes sem alterações na sequência de DNA e que passam a ser hereditárias (BERGER *et al.*, 2009). A regulação do epigenoma é fundamental para o crescimento celular e desenvolvimento; alterações no epigenoma podem resultar em uma condição anômala de expressão gênica e doenças, incluindo o câncer (BAYLIN & JONES, 2011).

A análise do epigenoma do câncer de mama revelou perfis característicos para cada subtipo descrito (HOLM *et al.*, 2010). Como exemplo, o subtipo basal-*like* apresentou menor padrão de metilação nas ilhas CpG, quando comparado aos outros subtipos de câncer de mama (LISTER *et al.*, 2009). Em contrapartida os subtipos hormônio positivos (RE+/RP+) foram observados apresentando um padrão bastante aumentado de metilação nas ilhas CpG (FANG *et al.*, 2011). Foi também descrito que a hipermetilação da ilha CpG da região promotora do gene *BRCA1* ocorre em aproximadamente 10-15% dos casos de câncer de mama esporádico, contribuindo assim, para o acúmulo de alterações genéticas que favorecem o desenvolvimento e progressão do câncer (ESTELLER *et al.*, 2000).

A participação de miRNAs no processo de carcinogênese mamária vem sendo cada vez mais analisada. Os resultados indicam que os miRNAs estão efetivamente envolvidos na regulação de processos relevantes na progressão tumoral (GOH *et al.*, 2015). Alguns estudos sugerem os miRNA como marcadores prognósticos para diferentes subtipos de câncer de mama. Bockmeyer e colaboradores (2011), por exemplo, diferenciaram os subtipos luminal e basal pela especificidade do perfil de expressão de miRNAs. Esta aplicação de expressão dos miRNAs fornece a possibilidade de utilizá-los como potenciais marcadores de prognóstico e de diagnóstico na intervenção terapêutica.

O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes aspectos morfológicos, características moleculares, comportamento relacionado à progressão e resposta à terapia (POLYAK, 2011). A terapêutica no câncer de mama, desta forma, baseia-se na disponibilidade de fatores diagnósticos, prognósticos e preditivos consistentes para orientar a decisão e a escolha de diferentes tipos de tratamentos (HAYNES *et al.*, 2009). Neste sentido, novos métodos acessíveis são necessários para auxiliar no prognóstico e diagnóstico das pacientes, bem como, contribuir para um tratamento adequado de acordo com as características do tumor e de seus biomarcadores.

2.2.3 Classificação do Câncer de Mama

O câncer de mama pode ocorrer em qualquer tipo celular da glândula mamária, exibe uma variedade de características morfológicas, e diferentes perfis imunohistoquímicos, além de subtipos histopatológicos. O carcinoma é a lesão

maligna mais comumente observada na mama, outros tipos de lesões como sarcomas e linfomas também podem ser encontradas, porém menos frequentemente (LI *et al.*, 2015).

Os carcinomas mamários são classificados, em geral, de acordo com os dois principais sítios de origem: ductos e lóbulos mamários que originam, respectivamente, os carcinomas ductais e lobulares. Alterações em outros tipos de células mamárias resultam em carcinomas mais raros, como os mucinosos, papilares e medulares. (ROSAI, 2011).

Carcinomas *in situ* apresentam proliferação de células epiteliais, limitada pela extensão dos ductos ou lóbulos, ou seja, neste tipo de carcinoma, o tumor não invade o estroma de tecidos adjacentes, encontrando-se dentro dos limites da membrana basal. Os carcinomas ductais *in situ* correspondem a 23% dos casos enquanto que os carcinomas lobulares *in situ* ocorrem em 3% dos casos diagnosticados (MAKKI, 2015). Os carcinomas invasivos apresentam a capacidade de invadir a membrana basal e colonizar tecidos distantes do local de origem do tumor primário. Como os *in situ*, os ductais invasivos são os mais frequentes, correspondendo de 65 a 80% dos casos de câncer de mama, enquanto que os lobulares invasivos correspondem a 10% dos casos diagnosticados (BATEMAN, 2007).

A classificação dos tumores de mama utiliza o sistema TNM (INCA 2004) que tem como principal objetivo a classificação por extensão anatômica da doença. Este sistema de classificação foi desenvolvido por Pierre Denoix entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1952). A necessidade de se classificar os casos de câncer em grupos resultou da observação de que as taxas de sobrevivência eram maiores nas pacientes com a doença localizada, do que naquelas em que a doença tinha se estendido além do seu órgão de origem.

Segundo o Cancer Research UK (2016), a avaliação da extensão do câncer de mama é importante pois auxilia na determinação de um melhor tratamento para a paciente. O sistema utiliza os seguintes parâmetros para avaliar a extensão da doença: tamanho do tumor (T); presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástase à distância (M) Informações adicionais sobre o sistema de classificação TNM podem ser encontradas em:

http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15%20MAy2011.pdf (Acesso em Setembro de 2016)

Os tumores de mama são também classificados segundo o grau de diferenciação histológica, com bases em parâmetros de diferenciação celular, formação do túbulo/glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas (ELSTON & ELLIS, 1991). Segundo estes critérios, os tumores são classificados combinando o score destes parâmetros, como: bem diferenciados (grau I); moderadamente diferenciados (grau II) ou pouco diferenciados (grau III).

Por se tratar de uma doença complexa, a heterogeneidade do câncer de mama pode ser avaliada através de parâmetros clínicos (classificação TNM e grau histológico) e de biomarcadores imunohistoquímicos usados amplamente na clínica, como o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), e receptor do fator de crescimento epidermal (HER2).

Os primeiros trabalhos do perfil de expressão gênica e a diversidade fenotípica do câncer de mama foram realizados por Perou e colaboradores (2000), e por Sorlie e colaboradores em anos seguintes (2001 e 2003). Nestes primeiros trabalhos, os tumores de mama foram divididos em cinco grupos principais: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, basal e “normal *like*”.

O subtipo luminal A é o mais comum, representando 50-60% dos casos. Este subtipo apresenta receptor de estrogênio e progesterona positivos e HER2 negativo, além de um baixo nível de proliferação celular, mensurado pelo Ki67 (<14%). Pacientes diagnosticadas com o subtipo luminal A apresentam um melhor prognóstico, e seu índice de recidiva é de aproximadamente 27,8%, sendo significativamente menor do que os dos outros subtipos (EROLES *et al.*, 2012).

O luminal B representa 20-25% dos casos de câncer de mama, e comparativamente ao luminal A, apresenta um fenótipo mais agressivo, maior grau histológico, maior índice proliferativo e pior prognóstico. Quanto ao seu perfil imunohistoquímico, este subtipo é caracterizado pela baixa expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, ERBB2 negativo e Ki67 > 14% (EROLES *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2016).

O subtipo *HER2* enriquecido corresponde a cerca de 15-20% dos casos de câncer de mama. São caracterizados pela alta expressão do gene *HER2* e dos

genes que estão associados a sua via. Em relação às características morfológicas, apresentam altos índices de proliferação, 75% exibem alto grau histológico e 40% tem mutações no gene *TP53*. Além disso, seu prognóstico é considerado desfavorável ao subtipos luminais (EROLES et al., 2012).

O subtipo basal *like* representa 10-20% dos casos de câncer de mama. Esta denominação deve-se ao fato desses tumores expressarem genes que estão presentes usualmente no tecido mioepitelial da mama normal, incluindo genes que codificam as citoqueratinas de alto peso molecular, como: CK5, CK17, P-caderina, CD44 e EGFR. Este tumor é comum em mulheres mais jovens, apresenta alto grau histológico, desenvolve com frequência metástases em linfonodos axilares e apresenta um prognóstico desfavorável quando comparado com os subtipos luminais (EROLES et al., 2012).

O normal like é observado em 5-10% dos casos diagnosticados de câncer de mama. Este subtipo ainda é bastante controverso por não apresentar distinção clara, nem um valor clínico definido (EROLES et al., 2012).

Na última década, muitos estudos tiveram como principal objetivo elucidar as características moleculares do câncer de mama. O avanço metodológico permitiu aos pesquisadores obter informações com maior resolução sobre a natureza do câncer de mama, demonstrando a necessidade de estabelecer a interligação entre várias vias de sinalização. Foi verificado que tanto o microambiente celular quanto as características do paciente tem influência sob a fisiopatologia e o tratamento da doença.

Neste contexto, o advento de plataformas de alto rendimento para análise de expressão de genes, como os microarrays, possibilitou o desenvolvimento de estudos que desafiaram o conhecimento de que o câncer de mama é uma doença única com variações de comportamento clínico e características histopatológicas (GRUVBERGER et al., 2001). Estudos de microarray resultaram no conceito de que o câncer de mama consiste em um conjunto de diferentes doenças que afetam o mesmo órgão e originado da mesma estrutura anatômica (o ducto, por exemplo), mas com diferentes características histopatológicas, de prognóstico e de resposta a tratamento (REIS-FILHO et al., 2011). Os resultados de análises de expressão de genes por microarray, determinaram que a classificação anteriormente apresentada

(PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001,2003) fosse ampliada, incluindo-se os subtipos claudina baixa e apócrino molecular, definindo-se sete subtipos: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, basal like, normal like, claudina baixa e apócrino molecular.

O subtipo claudina baixa é caracterizado pela baixa expressão de genes relacionados à adesão celular, incluindo as claudinas 3, 4 e 7, alta expressão de marcadores da Transição Epitelial-Mesequimal (TEM) e baixa expressão de genes de marcadores luminiais (RE, RP, CK18, CK19) (EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo apócrino molecular corresponde a 8-15% dos casos de câncer de mama e é caracterizado por ser positivo para os receptores de androgênio (RA), para marcadores basais como CK5, CK6 e negativo para RE (CHA *et al.*, 2012).

Observa-se que houve um importante avanço na classificação do câncer de mama, resultando num melhor conhecimento da doença. No entanto, sua aplicação na rotina clínica é ainda limitada, principalmente devido ao alto custo, e o diagnóstico baseado em marcadores imunohistoquímicos é ainda o mais usado (EROLES *et al.*, 2012).

3. O gene *TP53*

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

A proteína p53 humana é um ativador transcricional (LEVINE, 1997) e atua como um fator de transcrição tetramérico sendo que cada monômero tem 393 aminoácidos organizados em domínios bem definidos. Três domínios são reconhecidos nesta proteína. O primeiro, o domínio amino-terminal (N-terminal) responsável pela sua atividade de transcrição. Neste domínio ocorre a interação com outras proteínas que atuam como fatores de transcrição como o Mdm2, por exemplo, a proteína que também é responsável pela degradação da própria proteína p53 e assim determina sua estabilidade. O segundo domínio é representado pela região de ligação ao DNA e onde se encontra a maioria das mutações reportadas

associadas a câncer. O terceiro domínio, localizado na região carboxi-terminal da proteína contem a região de tetramerização e o domínio regulatório que modula a atividade da proteína.

Para desempenhar sua função regulatória, as moléculas da proteína p53 (monômeros) se associam para formar tetrâmeros. Nesta conformação tridimensional, a proteína p53 atua contendo o crescimento celular ou induzindo a apoptose (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A FIGURA 2 representa de forma esquemática a organização do gene *TP53* e da proteína p53.

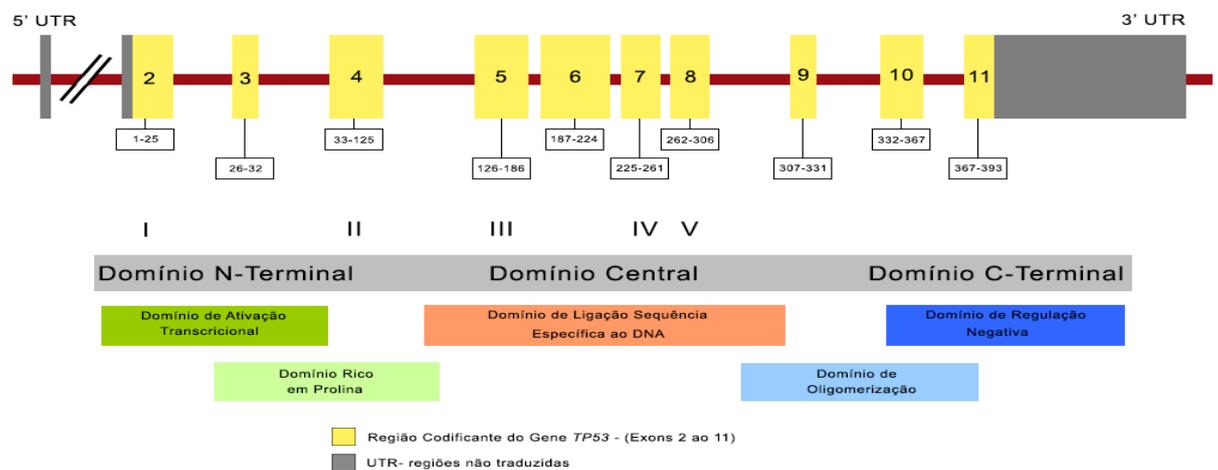


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO GENE *TP53*. FONTE: A AUTORA, ADAPTADO DE (<http://openwetware.org/wiki/Image:Hosp-misc-ipactr39-1202.gif>)

Conhecida como “guardiã do genoma”, a proteína p53 desenvolve uma função central na manutenção da integridade do genoma, controlando a proliferação e a morte celular, em resposta a vários sinais, incluindo danos ao DNA, falta de nutrientes a célula, hipóxia, stress oxidativo e sinais hiperproliferativos (BIEGING *et al.*, 2014). Uma vez ativada, a p53 exerce 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.*, 2009). Em resumo, a principal função da

proteína p53 é garantir que uma célula anormal não complete corretamente o processo de divisão celular.

A survivina é uma das proteínas relacionadas à apoptose negativamente regulada pela proteína p53 (LI *et al.*, 2008). Mutações no gene *TP53* foram associadas com aumento da expressão da proteína survivina, o que sugere um aumento da sobrevivência celular com consequente resistência à terapia para o câncer (VÉGRAN *et al.*, 2007). Outro mecanismo de regulação da proteína p53, é a ativação do gene *WAF1* (ou *CDKN1A*), que codifica uma proteína quinase dependente de ciclina (CDK), denominada p21. No início do ciclo mitótico, o gene *TP53*, através do seu fator de transcrição, ativa o gene *WAF1*, induzindo à síntese da proteína p21. Em resposta ao aumento dos níveis da proteína p21, os complexos ciclina-CDK, nos quais a proteína p21 se liga, perdem a capacidade de fosforilar proteínas supressoras de tumor da família RB. A hipofosforilação da proteína RB permite o sequestro do fator de transcrição E2F, essencial para a síntese proteica no sistema de replicação do DNA, desta forma, bloqueando a progressão do ciclo celular anteriormente à fase S (OREN & ROTTER, 1999). A ativação da proteína p53 pode ocorrer através de uma de três vias independentes: 1) danos no DNA, causados por radiação ionizante, por exemplo; 2) sinais aberrantes de crescimento; 3) quimioterápicos. Essas três vias inibem a degradação da proteína p53 estabilizando-a no núcleo, permitindo que ela desempenhe sua função como ativador transcricional (VOGELSTEIN *et al.*, 2000). A prevenção da degradação da proteína p53, ou seja, a ativação da proteína p53 e consequente ativação dos genes-alvos se dá através da sua fosforilação no resíduo de Ser15, na porção amino-terminal, pela proteína ATM (DIMITRIO, 2013).

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 & 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, por interação com proteínas virais ou celulares (comportando-se na forma equivalente a uma mutação do gene), determina um aumento da instabilidade genômica, que aumenta a frequência de amplificações 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 & PRIVES, 2006).

Estudos envolvendo o sequenciamento de genoma de células cancerosas, confirmam que o gene *TP53* é um dos mais frequentemente mutados na maioria dos cânceres humanos (KANDOTH *et al.*, 2013). Estas mutações ocorrem em frequências estimadas de 96% em tumores ovarianos, 86% em carcinoma de pequenas células de pulmão e 75% dos casos de câncer de pâncreas (KIM *et al.*, 2015). A maioria dos estudos indicam que a presença de *TP53* mutado é associada com um pior prognóstico na maioria dos casos de câncer (BROSH & ROTTER 2009).

Existem diferentes mecanismos pela qual a mutação do gene *TP53* contribui para a progressão tumoral. Mutações no gene *TP53* geralmente resultam na perda do alelo selvagem e formação de uma proteína com efeito dominante-negativo. Além disto, algumas mutações apresentam ganho de função (GOF), o que contribui para o desenvolvimento e progressão do tumor (MULLER & VOUSDEN, 2013). Uma importante GOF está relacionada com a capacidade da proteína p53 mutada diminuir a expressão de outras proteínas supressoras de tumor, como p63 e p73, que fazem parte da família da proteína p53 (ADORNO *et al.*, 2009). Uma outra forma e representada pelo ganho de função que confere uma vantagem de crescimento seletiva para células que expressam a forma do gene *TP53* mutante.

Aproximadamente 70% das mutações no gene *TP53* são classificadas como *missense*, e a maioria dos casos ocorre na região do gene responsável pela ligação ao DNA, que compreende os éxons 5 a 8 (PETITJEAN *et al.*, 2007). Apesar de ser amplo o espectro de mutações *missense* neste gene, observa-se a ocorrência de mutantes “hotspots”, principalmente nos resíduos R237, R248, R175, e G245 da proteína p53, sendo estes os mais observados em mutações esporádicas e germinativas associadas à Síndrome de Li Fraumeni (MALKIN, 2011).

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome de predisposição ao câncer e de caráter autossômico dominante representado por mutações germinativas no gene *TP53*. A síndrome de Li-Fraumeni (SLF), 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 de idade ou sarcoma em qualquer idade (LI, FRAUMENI *et al* 1988). Os principais tipos de tumores associados a SLF são sarcomas, câncer de mama, leucemia e tumor de córtex adrenal (*International Agency for Research on Cancer - IARC*). Desde a definição clássica da SLF foi observado que algumas famílias apresentavam algumas características, porém não todos os critérios da doença. Essas famílias passaram então a ser denominadas como portadoras da Síndrome de Li Fraumeni-like (SFL-like), que exclui a presença de um probando com sarcoma (BIRCH *et al.*, 1994).

A SLF é associada 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. Porém 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 (OLIVIER, *et al.*, 2010; KAMIHARA *et al.*, 2014).

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa no Câncer (IARC) aproximadamente 23% dos casos de câncer de mama apresentam mutações somáticas no gene *TP53*, sendo cerca de 68% delas classificadas como missense. Nesta mesma base de dados é possível identificar 28 trabalhos da literatura que relatam um pior prognóstico para as pacientes com câncer de mama portadoras de mutações no gene *TP53*.

Estudos recentes de Sequenciamento de Nova Geração de células tumorais mamárias identificaram que a frequência das mutações no gene *TP53* está intimamente relacionada com o subtipo do tumor. Mutações são encontradas em 17% dos casos de tumores Luminal A, 41% de tumores Luminal B, 88% dos casos de tumores Triplo Negativos e 50% dos HER2 positivos (DUMAY *et al.*, 2013). Acredita-se que as mutações no gene *TP53* apresentam diferentes consequências nos diferentes subtipos tumorais. Em tumores luminiais, há evidência de que a inativação de p53 por mutação ou por amplificação de *MDM2* ou *MDM4* é possivelmente determinante na formação do fenótipo Luminal e na criação de resistência à terapia endócrina (ELLIS & PEROU, 2013). Já em tumores Triplo Negativos, foi observado que a proteína p53 está envolvida na regulação do

processo de Transição Epitélio – Mesenquimal, a partir da super ativação de miR-200c (CORADINI et al., 2012). Ochs-Balcom e colaboradores (2015), observaram que mulheres diagnosticadas com câncer de mama e portadoras de mutações no gene *TP53*, apresentam tumores com características bem definidas: baixa diferenciação do tumor, alto grau histológico, ausência de marcadores hormonais e tumores altamente proliferativos, principalmente em casos pós-menopausa.

É possível que a regulação do gene *TP53* em tumores mamários também esteja controlada por miRNAs. Certos miRNAs atuam diretamente na molécula de mRNA do gene *TP53* e regulam negativamente sua expressão, como miR-125b (WU et al., 2013), miR-375(LIU et al., 2013) e miR-504(FORD et al., 2013). Um estudo realizado com modelos murinos induzidos a desenvolver câncer de mama pós-menopausa, sugere que miR-504 induzido por altos níveis de obesidade, contribui para a inibição da proteína p53, bem como para a aceleração da progressão tumoral (FORD et al., 2013). Uma outra classe de miRNAs regula a expressão de p53 indiretamente, pois tem como alvos genes de sua via de sinalização. Por exemplo, miR-21 antagoniza a ação da via de p53 através da inibição de genes relacionados a *TP53*. Reciprocamente p53 regula a transcrição de alguns miRNAs, como miR-200c (ZHANG et al., 2011). Foram identificados 22 miRNAs que tem sua regulação controlada pela proteína p53, e em sua maioria, estes miRNAs desempenham funções relacionadas ao controle e a proliferação celular (ZHOU et al., 2015).

Considerando as funções e processos nos quais a proteína p53 está envolvida, estudos sobre aspectos epidemiológicos e funcionais são relevantes, principalmente no que se refere ao câncer, uma vez que podem fornecer informações adicionais para um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios que envolvem a proteína p53.

3.1 A Mutação R337H *TP53* em Linhagem Germinativa

A mutação R337H *TP53* é caracterizada pela troca de uma arginina por uma histidina no éxon 10 no códon 337 do gene *TP53* (R337H CGC → CAC). A troca destes aminoácidos resulta em um erro de dimerização da proteína p53, conhecida por apresentar uma estrutura de tetrâmero como sua forma funcional de supressora de tumor (STURZBECHER *et al.*, 1992).

A maioria das mutações no gene *TP53* que origina tumores são mutações de ponto que ocorrem no domínio de ligação ao DNA, e resultam em proteínas com alterações na sequência específica de ligação (YAN & CHEN, 2010). Este domínio de ligação ao DNA está localizado entre os éxons 5 a 8 do gene *TP53*. Desta forma, a mutação R337H *TP53* ocorre fora (éxon 10) desta região de ligação ao DNA, estando localizada na região de dimerização da proteína p53.

O alelo R337H codifica uma proteína com mutação no domínio C-terminal. A troca pela histidina no códon 337 impede que este aminoácido atue como um doador de hidrogênio intramolecular quando o ambiente intracelular se encontra alcalino, e em altas temperaturas. Esta mudança de protonação, causada pela troca da arginina pela histidina, altera a formação dos tetrâmeros da proteína p53, resultando em moléculas instáveis com eventual perda de sua função (KAMADA *et al.*, 2016)

Uma característica particular da mutação R337H *TP53*, observada por DiGiammarino e colaboradores (2002) ao avaliar a estrutura e estabilidade da p53-R337H, refere-se ao seu comportamento sensível ao pH intracelular. Os autores observaram, que a proteína p53-R337H apresentava estabilidade dependente de pH, sendo a conformação em tetrâmero menos estável em pH alcalino. Em pH 7.7 a 37°C, aproximadamente 70% das p53-R337H encontravam-se desnaturadas, em contrapartida, a desnaturação de p53-wt só era observada em temperaturas acima de 50°C, independentemente do pH do meio intracelular.

No Brasil, a primeira vez que esta mutação foi identificada se deu no ano de 2001, por Ribeiro e colaboradores, analisando 25 famílias sem histórico familiar de câncer, em pacientes do Sul do Brasil. Foi encontrada uma incomum prevalência da mutação R337H *TP53*: 35 dos 36 pacientes analisados, diagnosticados com TCA, apresentavam a mutação. Esta mutação havia sido descrita em 1998 em apenas uma família da França (CHOMPRET *et al.*, 2001). A partir desta observação, foi

sugerido pelos autores, que a mutação R337H *TP53* fosse tecido específica (RIBEIRO *et al.*, 2001).

Outros estudos envolvendo famílias brasileiras das regiões Sul/Sudeste confirmaram outros tipos de tumores em indivíduos que apresentavam a mutação R337H *TP53*: câncer de mama (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; ACHATZ *et al.*, 2007; Assumpção *et al.*, 2008; CUSTÓDIO, 2011; GOMES *et al.*, 2012), câncer de estômago (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; CUSTÓDIO *et al.*, 2013), carcinoma de plexo coróide (SEIDINGER *et al.*, 2011, CUSTÓDIO *et al.*, 2013), câncer de cérebro (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; CUSTÓDIO *et al.*, 2013), neuroblastoma (SEIDINGER *et al.*, 2015), osteossarcoma (SEIDINGER *et al.*, 2011) câncer de próstata (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), câncer de pulmão (FIGUEIREDO *et al.*, 2006) e de fígado (FIGUEIREDO *et al.*, 2006)

A hipótese de ocorrência de Efeito Fundador para os pacientes das regiões Sul/Sudeste portadores da mutação R337H *TP53*, foi primeiramente avaliada por Pinto e colaboradores (2004) a partir da análise de dois *loci* polimórficos intragênicos (VNTRp53 e p53CA) no braço curto do cromossomo 17, em 22 indivíduos com a mutação e em 60 indivíduos sem a mutação. Foram encontrados dois diferentes alelos, ambos com 122bp, em 56,8% (VNTRp53) e 54,5% (p53CA) de 44 alelos dos indivíduos com a mutação e em 18,3% e 14,2% dos 120 alelos dos indivíduos sem a mutação, respectivamente. A partir destes dados, foi proposto que a ocorrência frequente no Estado do Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001) demonstrava estar associada com a ocorrência de Efeito Fundador.

Em anos seguintes, a hipótese de ocorrência de Efeito Fundador para a mutação foi novamente verificada utilizando-se 29 tag SNPs do gene *TP53*. A análise de 12 pacientes, não relacionados, portadores da mutação R337H *TP53*, identificou que os pacientes apresentavam o mesmo haplótipo. Foi ainda calculada a probabilidade de que este haplótipo tenha ocorrido de forma independente nos 12 casos estudados. O resultado desta probabilidade sendo de $3,1 \times 10^{-9}$, afasta a possibilidade de eventos independentes, reforçando a hipótese de um Efeito Fundador (GARRITANO *et al.*, 2010).

Ainda não é conhecida a origem geográfica da mutação R337H *TP53*. No trabalho realizado por Garritano e colaboradores (2010), a partir de análises do

HapMap, observou-se que o alelo correspondente a mutação R337H *TP53*, provavelmente tenha ancestralidade Europeia.

A primeira identificação de um indivíduo portador da mutação R337H *TP53* fora do Brasil, ocorreu em Manchester; Inglaterra (VARLEY *et al.*, 2000) como mutação somática e na França como mutação germinativa (CHOMPRET *et al.*, 2001)

Pacientes de três centros portugueses de Oncogenética, foram estudados mas nenhum portador da mutação foi identificado (ACHATZ, 2008). Outro estudo foi conduzido utilizando pacientes europeus, provenientes da Alemanha. Foi identificado um paciente portador da mutação R337H *TP53* diagnosticado com TCA, porém a análise de tag SNPs para este paciente, revelou um haplótipo diferente para o alelo, daquele encontrado em pacientes brasileiros, indicando ocorrência independente entre eles (HERRMANN, *et al.*, 2011). Análises de ancestralidade em pacientes do Estado do Paraná, sugerem que o alelo R337H *TP53* mutante tenha surgido há pelo menos 110 anos atrás (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

Levando em consideração a elevada frequência da mutação R337H *TP53* na amostra de pacientes diagnosticados com TCA, por Ribeiro e colaboradores (2001) no Estado do Paraná, foi realizado um estudo populacional em recém nascidos de todo o Estado. Foram analisados 171.649 e identificados 461 com a mutação, sendo portando, de 0,27% a frequência estimada de indivíduos portadores da mutação (CUSTÓDIO *et al.*, 2013).

Estimativa similar da frequência populacional da mutação R337H *TP53* foi encontrada por Palmero e colaboradores (2008) analisando 750 mulheres participantes de um grupo de monitoramento para o desenvolvimento de câncer de mama. Foram encontradas duas mulheres (0,27%) portadoras da mutação R337H *TP53*, ambas com história familiar de câncer de mama, porém sem se enquadrar nos critérios da Síndrome de Li Fraumeni.

Outra característica particular da mutação R337H *TP53* refere-se à sua baixa penetrância. A partir do trabalho de Figueiredo e colaboradores (2006), a penetrância da mutação foi calculada em, aproximadamente, 10%. Em contrapartida, as mutações que se localizam no domínio central de ligação ao DNA do gene *TP53* apresentam penetrância de aproximadamente 50% (ACHATZ &

ZAMBETTI, 2016). Desta forma, levando em conta que a mutação R337H *TP53* está relacionada com tipos preferenciais de casos de câncer, e que portadores da mutação com o mesmo tipo de câncer apresentem diferentes tipos de prognóstico, especula-se que haja modificadores de penetrância associados com a mutação (ACHATZ, 2008).

Considerando o número estimado de 200.000 indivíduos com a mutação R337H *TP53* (CUSTÓDIO *et al.*, 2013), é considerável prever que a mutação ocorra em outros países pela circulação de imigrantes brasileiros. Neste contexto, Legal e colaboradores (2015), estimaram a frequência da mutação R337H *TP53* em municípios do Paraguai, localizados na fronteira com o Brasil, e além disso muitos descendentes de imigrantes brasileiros moram no Paraguai. Foram genotipadas 10 mil amostras de sangue de moradores dessa região, e então identificados 5 ocorrências da mutação entre esses casos. Este resultado, sugere que além do Brasil, outros países podem ter famílias portadoras da mutação.

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*. Ribeiro e colaboradores (2007) observaram que a mutação tem uma especificidade órgão dependente e penetrância relativamente baixa (aproximadamente 10% durante a primeira década de vida) para o desenvolvimento de câncer e não relacionam a mutação R337H *TP53* com o desenvolvimento das SLF ou SLF *like*. Já, 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*.

3.1.2 A Mutação R337H *TP53* e o Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo mais comum dos casos de câncer diagnosticados em adultos com mutações no gene *TP53*, representando 25% dos casos (BORRESEN *et al.*, 1992).

A partir de estudos populacionais e da posterior análise das famílias que segregavam a mutação R337H *TP53*, o câncer de mama foi identificado frequentemente em pacientes portadoras da mutação.

Achatz e colaboradores (2007) analisaram comparativamente pacientes com história familiar indicativa para Síndrome de Li Fraumeni (n=45) e pacientes saudáveis (n=53) quanto a presença da mutação R337H *TP53*. Foram encontrados seis pacientes portadores da mutação no grupo indicativo para a Síndrome de Li Fraumeni. Entre as famílias destes indivíduos portadores da mutação, vários tipos de câncer foram encontrados, como de mama (30,4%), cérebro (10,7%), sarcoma de tecidos moles (10,7%) e TCA (8,9%).

A frequência da mutação R337H *TP53* foi avaliada também por Palmero e colaboradores (2008) analisando 750 mulheres participantes de um grupo de monitoramento para o desenvolvimento de câncer de mama. Foram encontradas duas mulheres (0,27%), da mesma família, portadoras da mutação R337H *TP53*, ambas com história familiar de câncer de mama, porém que não se enquadravam no critérios da Síndrome de Li Fraumeni.

Em um estudo populacional realizado por Custódio e colaboradores (2013), foram analisados 171.649 recém-natos no Estado do Paraná sendo observados 461 com a mutação R337H *TP53*, definindo a sua frequência em 0,27%. No mesmo trabalho a autora analisou 353 famílias, dos 461 recém-natos identificados com a mutação entre os anos de 2005 e 2010. Nestas famílias, foi possível identificar o lado parental que estava segregando a mutação, observando-se que a prevalência, de qualquer tipo de câncer entre os parentes que segrega a mutação, foi 3,5 vezes maior do que o lado da família que não era portador da mutação (550/158). Entre os indivíduos analisados neste trabalho (CUSTÓDIO *et al.*, 2013), o tipo mais frequente de câncer encontrado entre as crianças portadoras da mutação R337H *TP53* foi o TCA (n=48) e tumor de cérebro (n=6). Em adultos, os tipos mais frequentes de câncer foram os de mama (n=80), estômago (n=79) e de cérebro (n=25). O estudo mostrou que: em 87 das 353 (24,7%) famílias foram observados três ou mais casos de câncer se enquadravam nos critérios de SLF *like*, (BIRCH *et al.*, 1994), 40,5% (143/353) tiveram histórico de câncer, porém não se enquadraram em nenhum critério de síndrome de câncer familiar e 34,8%(123/353) das famílias, com exceção do probando diagnosticado com TCA, não relataram casos de câncer.

Gomes e colaboradores (2012), analisaram a frequência da mutação R337H *TP53* em uma população de 390 mulheres diagnosticadas com câncer de mama no

Estado do Rio de Janeiro. Foram encontradas duas pacientes com a mutação (0,5%), ambas com idade precoce ao diagnóstico (35 e 39 anos). Além disto, as duas pacientes apresentavam histórico familiar de câncer de mama e de outros tipos de câncer. Neste sentido, os autores sugeriram a importância do teste genético para esta mutação em pacientes com idade precoce ao diagnóstico, história familiar de câncer e tratamento anterior decorrente de outros tipos de câncer.

A ocorrência da mutação R337H *TP53* foi avaliada por Giacomazzi e colaboradores (2014) em dois grupos de pacientes diagnosticadas com câncer de mama: (1) 59 mulheres com histórico familiar de câncer, sugestivo para câncer hereditário, porém sem se enquadrar nos critérios das SLF ou SLF *like* e (2) 815 mulheres sem histórico familiar de câncer diagnosticadas antes dos 45 anos ou aos 55 anos ou mais. Foram encontradas 3,4% (2/59) e 8,6% (70/815) de mulheres portadoras da mutação nos grupos 1 e 2, respectivamente. Além disso, a presença da mutação R337H *TP53* foi maior em mulheres diagnosticadas antes dos 45 anos (12,1%) quando comparados com o grupo de mulheres diagnosticadas aos 55 anos ou mais (5,1%).

A partir dos resultados dos trabalhos de Ribeiro e colaboradores (2001), Figueiredo e colaboradores (2006) Achatz (2008), Custódio (2011), Gomes e colaboradores (2012) e Giacomazzi e colaboradores (2014), observa-se que não é possível associar a presença da mutação R337H *TP53* com o desenvolvimentos SLF ou SLF-*like*. Portanto, pode-se considerar, devido aos padrões heterogêneos de suscetibilidade de câncer individual e familiar que a mutação R337H *TP53* pode ser uma fator contribuinte para o desenvolvimento do espectro de cânceres relacionado com a SLF ou SLF-*like*, mas também pode contribuir para suscetibilidade de forma, aparentemente esporádica, na população brasileira (ACHATZ & ZAMBETTI, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e mais comum em mulheres. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA,2016), a expectativa é de 57.960 novos casos da doença no Brasil, para os anos de 2016 e 2017. Neste sentido, estudos populacionais são de grande importância para identificação de fatores etiológicos ligados ao desenvolvimento do câncer, subsidiando o estabelecimento de estratégias de prevenção mais eficientes.

Uma das alterações genéticas mais frequentemente observadas em cânceres humanos são mutações no gene *TP53* (JOERGER & FERSHT,2008). O câncer de mama é o tipo mais comum dos casos de câncer diagnosticados em adultos com tais mutações, representando 25% dos casos (BORRESEN *et al.*, 1992). Mutações germinativas no gene *TP53* são associadas com a Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e a Síndrome de Li Fraumeni *like* (SLF-*like*) (LI, FRAUMENI *et al.*, 1988)

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a mutação R337H *TP53* é mais frequente do que em outras partes do mundo (~1:300) (PIOVEZAN *et al.*, 2006; CUSTÓDIO *et al.*, 2013), atribuindo-se a este fato o Efeito Fundador (PINTO *et al.*, 2004). A análise das famílias dos indivíduos portadores da mutação R337H *TP53*, observou-se a ocorrência de vários tipos de casos de câncer, entre eles o câncer de mama (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; ACHATZ *et al.*, 2007; CUSTÓDIO *et al.*, 2013). 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. Além disso, são poucas as informações disponíveis sobre a associação da mutação R337H *TP53* com os parâmetros clínico histopatológicos utilizados no diagnóstico das pacientes com esta enfermidade.

Também, foi de interesse avaliar a instabilidade genômica relacionada com a presença/ausência da mutação R337H *TP53*. Tal abordagem pode fornecer evidências adicionais para melhor compreensão do envolvimento da mutação no processo de carcinogênese mamária.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estimar a prevalência da mutação R337H *TP53* em pacientes com carcinomas mamários atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças e no Clínicas da cidade de Curitiba, Paraná e analisar a instabilidade genômica entre os grupos de pacientes analisados.

4.2 Objetivos Específicos

1. Estimar a prevalência da mutação R337H *TP53* em pacientes diagnosticadas com carcinomas mamários;
2. Comparar estatisticamente os dados clínico-histopatológicos obtidos das pacientes com a mutação R337H *TP53* com os das pacientes sem a mutação;
3. Analisar a instabilidade genômica por Hibridização Genômica Comparativa por *array* (*array*-CGH) em pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*;
4. Comparar estatisticamente os dados de instabilidade genômica das pacientes com a mutação R337H *TP53* com os das pacientes que não apresentam a mutação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção das Amostras

As amostras de tecido de tumor mamário fresco foram obtidas durante procedimento cirúrgico nos Hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas, da Universidade Federal do Paraná, ambos da cidade de Curitiba (PR), e se encontram armazenadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. As amostras de tecido de tumor mamário fixados em bloco de parafina foram disponibilizadas pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba.

5.2 Caracterização da Amostra

Foram utilizadas 700 amostras de diferentes pacientes, provenientes do hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas, da UFPR. Destas, 418 eram amostras de tumores frescos armazenadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, e 282 estavam fixadas em blocos de parafina, disponibilizados pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças. Entre as 700 pacientes analisadas, 482 (69%) foram diagnosticadas com carcinoma ductal invasor, 48 (6,86%) com carcinoma ductal *in situ*, 4 com carcinoma lobular *in situ* (0,57%), 55 (7,86%) com carcinoma lobular invasor, 56 (8%) com outros tipos de carcinomas, como papilar, mucinoso, intraductal, 22 (3,14%) com carcinomas mistos, 28 (4%) tiveram laudos inconclusivos, 2 (0,29%) com Tumor Phyllodes, 2 com Doença de Paget (0,29%) e 1 (0,14%) não teve seu laudo encontrado.

A amostra foi subdividida em duas sub-amostras: pacientes com a mutação R337H *TP53* (n=11), e pacientes que não apresentavam a mutação (n=685). A média de idade, ao diagnóstico, do grupo de pacientes portadoras da mutação foi de $46,54 \pm 14,53$ anos e das pacientes não portadoras da mutação $55,43 \pm 14,96$ anos, sendo tal diferença estatisticamente significativa ($t=1,97$; $P<0,05$).

Para as comparações clinico-histopatológicas entre os dois grupos, selecionou-se 50 pacientes que não apresentavam a mutação de acordo com dois critérios prioritários: 1) que apresentassem carcinoma ductal invasor e 2) que apresentassem o maior número de informações nos diferentes parâmetros. Ao

diagnóstico, a idade média das pacientes com a mutação ($46,54 \pm 14,53$ anos) foi menor do que a das 50 pacientes sem a mutação ($58,52 \pm 15,18$ anos), sendo a diferença estatisticamente significativa ($t=2,39$; $P<0,05$) (FIGURA 3).

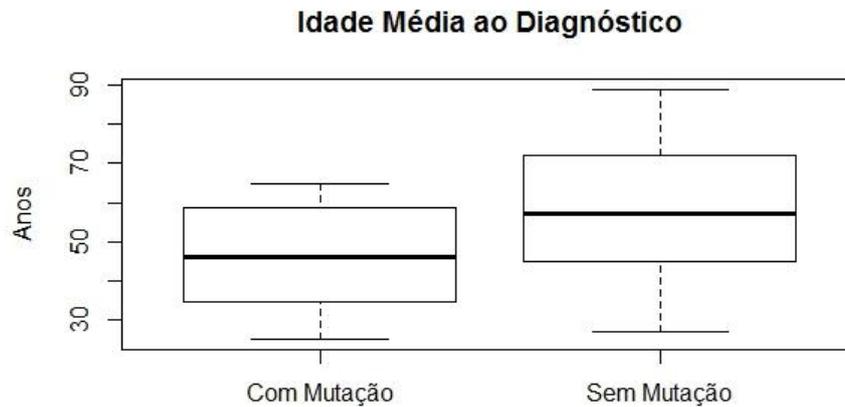


FIGURA 3- BOXPLOT DE DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES DAS PACIENTES COM E SEM A MUTAÇÃO R337H TP53

Os grupos de pacientes com e sem a mutação R337H TP53 foram avaliados, além da idade ao diagnóstico, de acordo com os seguintes parâmetros clínico-histopatológicos: tamanho, grau e estágio do tumor, presença de metástases em linfonodos, expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, expressão da proteína HER2, expressão de Ki67 e evolução clínica.

O tamanho do tumor foi analisado quantitativa e qualitativamente, neste caso, de acordo com a classificação TNM (INCA, 2004) na qual os tumores com tamanho menor do que dois centímetros (cm) são classificados como T1, com 2,1 a 5 cm como T2 e os maiores do que 5 cm como T3. A classificação TNM foi também utilizada para grau e estágio dos tumores.

Os grupos de pacientes estudados foram avaliados segundo a presença ou ausência de metástase em linfonodos. Não foi feita nenhuma diferenciação quanto ao tipo de linfonodo positivo para malignidade.

No que se refere à expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e da proteína HER2 (incluindo resultados da análise por FISH) os tumores foram classificados como positivos ou negativos, a partir de resultados de laudos

imunohistoquímicos. A expressão de Ki67 foi considerada positiva quando apresentou valores superiores a 14% e negativa com valores inferiores a 14%.

Em relação à evolução clínica as pacientes foram classificadas em: SED – sem evidência de doença, VCD – viva com a doença- e óbito. O tempo de sobrevivência das pacientes foi avaliado em meses desde a data do diagnóstico até a data limite utilizada para as análises deste trabalho em junho de 2016 ou da última consulta (UC) com o clínico responsável.

Os dados clínico-histopatológicos e de evolução clínica das pacientes com e sem a mutação R337H *TP53* estão apresentação nos APÊNDICES 1 e 2, respectivamente.

5.3 Extração e Quantificação do DNA

O método utilizado para a extração de DNA do tumor fresco foi o fenol-clorofórmio, como descrito a seguir: aos tubos de microcentrifuga contendo o tecido (0,02g) foram adicionados 80µL do tampão de proteínase K 5X, 40µL de proteinase K (10mg/ml), 20µL da solução de SDS (sodium dodecil sulfate) 20% e 240µL de água ultrapura. Esta mistura foi homogeneizada em agitador tipo Vortex e incubada em banho-maria a 56°C por cerca de 18 horas. Na sequência, o material foi incubado em bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, Em temperatura ambiente foi adicionado 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1, homogeneizando manualmente várias vezes. O material foi centrifugado a 17562.g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e repetiu-se esse procedimento. Foram adicionados 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5M e 2 volumes de etanol absoluto para a precipitação do DNA. O material foi deixado em freezer -20°C por 18 horas. Após este período, procedeu-se uma centrifugação por 20 minutos a 17562.g. O sobrenadante foi descartado e em seguida, adicionado 1mL de etanol 70%. O tubo foi invertido delicadamente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e a amostra de DNA ressuspensa em 30 a 50 µl de água ultrapura, sendo armazenada a -20°C.

Para as amostras parafinizadas, a extração de DNA foi realizada a partir do protocolo otimizado pelos pesquisadores do Lombardi Comprehensive Cancer Center da Universidade de Georgetown, Washington, DC, USA.

O procedimento é dividido em três etapas:

1ª etapa: Desparafinização – Este processo envolve a retirada da parafina do corte do material tumoral. Para isto, foram realizados três banhos de 1mL de xilol, seguidos sempre por agitação em aparelho tipo Vortex por 10 minutos e centrifugação por 5 minutos, a 17562.g ao final de cada banho descartando o sobrenadante. O último banho de xilol foi deixado por 18 horas em aparelho tipo Vortex, para garantir a retirada da parafina.

2ª etapa: Limpeza da Amostra – Resíduos de parafina foram então eliminados através de três banhos sucessivos de 1mL de etanol absoluto, seguidos por agitação em aparelho tipo Vortex por 10 minutos e centrifugação por 5 min a 17562.g ao final de cada banho, sempre descartando o sobrenadante. Ao final destes passos, foram adicionados às amostras 130µL de Tampão NIB (“Non Ionic Buffer”) e 70µL de Proteinase K (10mg/ml) e incubadas em banho-maria a 56°C por 18 horas.

3ª etapa: Extração de DNA - No terceiro dia do procedimento, o material era transferido ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos para inativação da Proteinase K e permanecia a temperatura ambiente para continuidade do procedimento. A extração de DNA é baseada no método do fenol-clorofórmio, como anteriormente mencionado para as amostras de tecido congeladas.

Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA através da absorbância medida em 260nm e 280nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000.

5.4 Genotipagem da Mutação R337H TP53

A genotipagem foi realizada utilizando sondas de hidrólise TaqMan. As sondas TaqMan são formadas por fluoróforos covalentemente ligados à extremidade 5' da sonda de nucleotídeos e uma molécula *quencher* ligado à extremidade 3'. A molécula *quencher* é responsável por capturar a fluorescência emitida pelo fluoróforo após a sua excitação. Atualmente existem no mercado muitos tipos de fluoróforos disponíveis para utilização, sendo FAM® e VIC® os mais utilizados nesse tipo de genotipagem. Essas sondas são desenhadas para se anelar em uma região específica do DNA, amplificada por um par de *primers*. Pela ação conhecida da enzima Taq polimerase, ela estende a molécula de DNA nascente a partir da fita molde 3'- 5', assim sua atividade exonuclease 5'-3' degrada a sonda que anelou na fita molde. A degradação da sonda liberta o fluoróforo e quebra sua proximidade

com o *quencher*, permitindo a captação da fluorescência do fluoróforo e detecção da quantidade pelo aparelho de PCR em tempo real (Life Technologies, 2014)

No caso da técnica de genotipagem, são utilizadas sondas diferentes de acordo com o número de alelos distintos para uma mutação ou um SNP. Cada sonda representa, desta forma, um alelo. Ocorrendo dois alelos para a característica analisada, as sondas mais frequentemente utilizadas são FAM® e VIC®. Pela diferença do sinal da fluorescência, emitida por essas sondas, é possível fazer uma discriminação alélica segura a partir desta técnica.

Para este trabalho, foram customizadas duas sondas que anelam na região do códon 337 do gene *TP53*, uma sonda correspondente ao alelo normal e outra correspondente ao alelo mutado.

As análises de genotipagem das pacientes foram preparadas em placas de 96 poços. Em cada placa, utiliza-se dois controles de reação brancos, um controle homocigoto positivo para a mutação R337H *TP53* e os 93 poços restantes podem ser utilizados, para as amostras das pacientes. Para as pacientes positivas, foi repetida a análise para a confirmação do resultado pelo mesmo método.

A reação de amplificação obedeceu o seguinte protocolo: 5µL de Master Mix Universal (2x) + 2,5µL de Água Ultrapura + 0,5µL da Sonda customizada (10x) + 3µL de DNA (20ng/µl). A reação de PCR foi feita no aparelho *ViiA™ 7 Real Time PCR* da empresa Applied Biosystems, seguindo o ciclo de temperatura apresentado na TABELA 1.

A identificação dos genótipos das pacientes analisadas para a mutação R337H *TP53* é apresentada nas FIGURAS 4 e 5. A FIGURA 4 representa uma paciente homocigota selvagem para a mutação. Isto pode ser observado pela marcação do alelo selvagem para a mutação, com a sonda VIC®, representada pela cor verde na figura, e o alelo mutado marcado com a sonda FAM®, representada pela cor azul e somente o alelo normal foi amplificado na reação. Já a FIGURA 5 representa uma paciente heterocigota para a mutação, e neste caso, os dois alelos foram amplificados na reação de PCR.

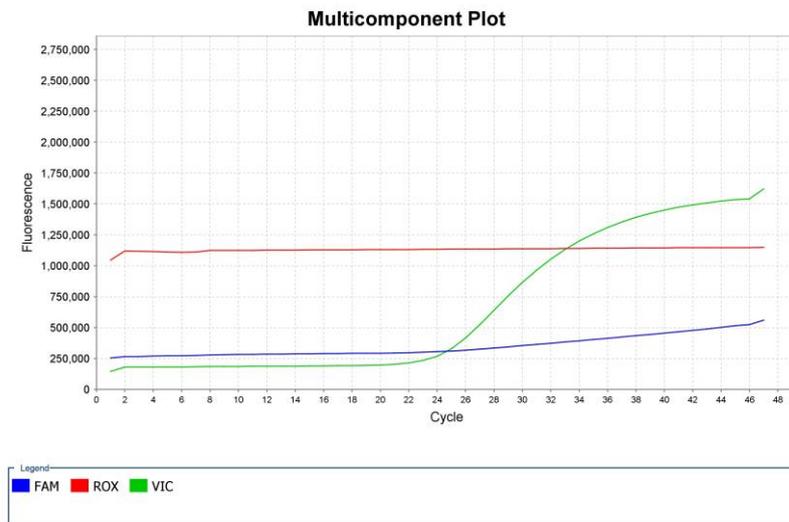


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM POR SONDA DE HIDRÓLISE TAQMAN. NESTA FIGURA, A AMPLIFICAÇÃO SOMENTE DO ALELO MARCADO PELA SONDA VIC®, REPRESENTA UMA PACIENTE HOMOZIGOTA SELVAGEM PARA A MUTAÇÃO R337H TP53.

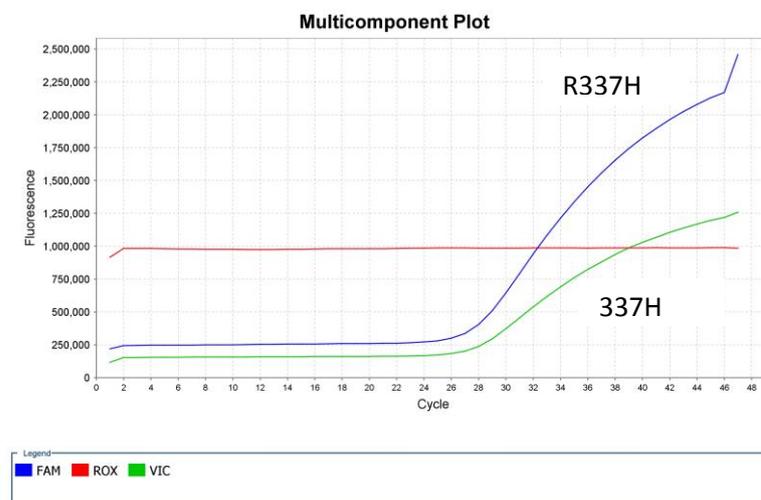


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM POR SONDA DE HIDRÓLISE TAQMAN. NESTA FIGURA, A AMPLIFICAÇÃO DOS ALELOS MARCADOS PELAS SONDA FAM® E VIC®, REPRESENTA UMA PACIENTE HÉTEROZIGOTA PARA A MUTAÇÃO R337H TP53.

TABELA 1- ETAPAS DA REAÇÃO DE PCR REALIZADAS NO APARELHO VIIA™ 7 REAL TIME PCR

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	95°C	10min
35x { Desnaturação Anelamento dos iniciadores Extensão final	95°C	15 seg
	60°C	30 seg
	72°C	1min

5.5 Sequenciamento pelo Método de Sanger

O método é baseado na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse (SANGER *et al*, 1977).

Os didesoxinucleotídeos são marcados com fluorescências distintas, o que permite a identificação dos quatro tipos de ddNTPs marcados (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Os ddNTPs não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo dNTP. Desta forma, quando os ddNTPs são adicionados à cadeia de DNA crescente, a extensão é interrompida, e é possível detectar a natureza do ddNTPs a partir da fluorescência emitida por ele. No final de vários ciclos, tem-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos, terminadas com diferentes ddNTPs.

Para este trabalho, a região sequenciada contém a mutação R337H *TP53* em um amplicon de 115pb. Os *primers* utilizados para a PCR deste fragmento estavam concentrados em 25µmoles e tinham as seguinte sequências: FOWARD: 5' CCATCTTTTAACTCAGGTACTGT 3'/ REVERSE: 5' TGAATGAGGCCTTGGA ACTC 3'.

Após a realização da PCR as amostras foram submetidas ao Método de Purificação de Produtos de PCR que utiliza Exonuclease I (Exo I) para eliminar o excesso de *primers* da reação e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

Para cada amostra foram adicionados 0,2µl de Exonuclease I (1 unidade/µl), 0,6µl de SAP (0,66 unidades/µl) a 3µl do produto de PCR. Esta mistura foi incubada a 37°C por 45 minutos em Termociclador *Mastercycler gradiente* (Eppendorf) e posteriormente a 80°C, por 10 minutos, também em termociclador para inativação das enzimas.

Em seguida as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para cada reação de sequenciamento, foram utilizados 0,5µl de *Ready Reaction Premix* (2,5X), 0,2 µl do primer forward (25µmoles), 2µl de Tampão *BigDye Sequencing Buffer* (5X), 1µl do produto de PCR tratado pelo EXO/SAP e água ultra pura até completar 10µl. O programa da ciclagem desta etapa está representado na TABELA 2.

TABELA 2- CICLAGEM DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO REALIZADA NO APARELHO VERITI™ APPLIED BIOSYSTEMS

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	96°C	1min
35x { Desnaturação Anelamento dos iniciadores Alongamento	96°C	15min
	54°C	15min
	60°C	4min

Na purificação de cada reação para retirada dos *primers*, terminadores fluorescentes e outras impurezas e obtenção de fragmentos de diversos tamanhos marcados com terminadores fluorescentes, eram adicionados 2 µl de acetato de sódio 3M (7,5 pH), 25 µl de etanol absoluto, centrifugação por 40 minutos a 17562.g, seguida de um spin invertido. O etanol absoluto atua depletando a camada de

hidratação dos ácidos nucleicos o que expõe as cargas negativas dos grupamentos fosfato. O acetato atua neutralizando estas cargas expostas o que permite a formação de precipitados de DNA. Na sequência eram adicionados 50 µl etanol 80%, centrifugação por 10 minutos a 17662.g, seguida de um spin invertido e evaporação do etanol no termociclador com a tampa aberta a 60°C durante 5 minutos.

O produto precipitado foi analisado em seqüenciador automático ABI-3530 Applied Biosystems, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e os dados coletados pelos softwares ABI-3530 Collection e Sequencing Analysis.

5.6 array-CGH

O método de *array*-CGH foi realizado em 5 pacientes com a mutação R337H *TP53* e em 9 pacientes sem a mutação, utilizando-se a plataforma de *arrays* (microarranjos) humanos, no formato de 8x 60K (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) contendo sondas específicas para todo o genoma humano, baseado no *database* do hg19 (*human genome* 19, USCS Genome Browser).

Digestão: 500 ng de DNA da amostra tumoral e de referência (DNA de um indivíduo sem câncer) foram digeridos, utilizando-se as enzimas *AluI* (10U/µl) e *RSaI* (10U/µl) por um período de 2 horas.

Marcação: Foi utilizado o *Bioprime Array CGH genomic labeling kit* (Invitrogen, Inc). As amostras tumorais foram marcadas com Cy3 (fluorocromo cianina 3 - verde) e os controles com Cy5 (fluorocromo cianina 5 - vermelho).

Hibridização: As amostras foram hibridizadas na presença de *Cot-1* DNA e *Blocking Agent* (10x) a 65°C, em rotação de 17562.g por 40 horas, seguindo-se as instruções do fabricante (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA).

Lavagem: A lavagem foi realizada em câmara especial com controle de ozônio.

Após essa etapa, os *arrays* foram escaneados utilizando-se o scanner da empresa Agilent.

5.7 Obtenção e análise das imagens

Após a avaliação da qualidade de hibridização de cada experimento e normalização dos dados pelo software *Feature Extraction software v10.10* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA), estes foram analisados pelo software *Agilent Cytogenomics v.4.0*, utilizando-se o algoritmo ADM-2 (threshold de 6.0) e filtros de análise apropriados. Amplificações e deleções foram consideradas na presença de um número mínimo de 3 sondas consecutivas, com valores superiores a $\log_2 (7/6)$ e inferiores a $\log_2 (5/6)$, respectivamente.

A classificação das alterações cromossômicas em amplificação, ganho, perda e deleção, foi obtida pela aplicação de um filtro considerando como CNV (variação do número de cópias), no mínimo 3 sondas consecutivas com expressão alterada e razão absoluta da média de $\log_2 0,3$. Como referência de comparação de CNV foi utilizado hg19 (USCS Genome Browser). As alterações foram classificadas a partir de análise prévia no software *Agilent Genomic Workbench* da seguinte forma: razão $\log_2 < 0,25$ = perda; razão $\log_2 > 0,25$ = ganho; razão $\log_2 > 1,5$ = amplificação; razão $\log_2 < -1,5$ = deleção. A razão \log_2 é definida por (T/R), em que T representa a expressão do gene na amostra teste e R na amostra referência.

5.8 Análise Estatística

O teste do qui ao quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar os dados de tamanho do tumor (classificação TNM), grau do tumor, metástase, expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, expressão da proteína HER2 e estágio do tumor entre as pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*. Foi também utilizado para avaliar a significância das diferenças das distribuições das alterações genômicas obtidas por *array-CGH* nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a expressão de Ki67. O teste *t* de Student foi empregado para comparar a significância das diferenças entre as médias dos tamanhos do tumor, das idades, do tempo de sobrevida das pacientes com e sem a mutação e das alterações genômicas obtidas por *array-CGH*. Utilizou-se o teste de Bartlett para avaliar a significância das diferenças entre os quadrados médios das distribuições das alterações genômicas obtidas por *array-CGH* nos dois grupos de pacientes.

5.9 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado em 6 de abril de 2013 pelo Comitê de Ética da Universidade Positivo, Curitiba, Paraná (Processo n. 09718912.8.0000.0093). Seu desenvolvimento ocorreu de forma multidisciplinar no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, com a participação efetiva de oncologistas clínicos do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, ambos de Curitiba, Paraná.

6. RESULTADOS

6.1 Frequências Genotípica e Alélica

Foram identificadas 11 pacientes heterozigotas para a mutação R337H *TP53* entre as 700 analisadas neste trabalho. O genótipo das pacientes positivas para a mutação foi confirmado em todos os casos através da técnica de Sequenciamento de Sanger.

As frequências genotípica e alélica, foram iguais a 1,57% (~1,6%) e 0,79% (~0,8%) respectivamente, sendo a frequência genotípica 5,93 (1,6%/0,27%) vezes maior do que a descrita por Custódio e colaboradores (2013), em uma amostra de recém nascidos do Estado do Paraná.

6.2 Associação com os parâmetros clínico-histopatológicos

As pacientes com e sem a mutação R337H *TP53* foram analisadas para os seguintes parâmetros histopatológicos: tamanho, grau e estágio do tumor, expressão do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP), expressão da proteína HER2. Os dados estatísticos da associação com parâmetros clínico-histopatológicos estão sumarizados na TABELA 3.

TABELA 3 – PARÂMETRÔS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS DOS CASOS ESTUDADOS NOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES

Variáveis	Grupo R337H TP53 Positivo	Grupo R337H TP53 Negativo	Valor de P
Idade (anos)	46,54 ± 14,53 (n=11)	58,52 ± 15,18 (n=50)	t=2,39; P<0,05
Tamanho do Tumor (cm)	3,02 ± 2,50 (n=11)	3,02 ± 1,62 (n=50)	
Tamanho do Tumor			
T1	36,36% (n=4)	30% (n=15)	
T2	54,54% (n=6)	64% (n=32)	
T3	9,1% (n=1)	6% (n=3)	$\chi^2_2= 0,17$; P>0,50
Grau Histológico			
I	10% (n=1)	18% (n=9)	
II	60% (n=6)	50% (n=25)	
III	30% (n=3)	32% (n=16)	$\chi^2_2= 0,49$; P>0,70
Metástase			
Presença	33,3% (n=3)	56% (n=28)	
Ausência	66,6% (n=6)	44% (n=22)	$\chi^2_1= 1,57$; P>0,20
Expressão de RE			
Positiva	62,5% (n=5)	56% (n=28)	
Negativa	37,5% (n=3)	44% (n=22)	$\chi^2_1= 1,23$; P>0,20
Expressão de RP			
Positiva	57,1% (n=4)	84% (n=42)	
Negativa	42,9% (n=3)	16% (n=8)	$\chi^2_1= 2,85$; P>0,05
Expressão de HER2			
Positiva	33,3% (n=2)	28% (n=14)	
Negativa	66,6% (n=4)	72% (n=36)	$\chi^2_1= 0,06$; P>0,80

Expressão Ki67			
Positiva	100% (n=4)	40% (n=20)	
Negativa		8% (n=4)	P=1
Estágio			
I	33,3% (n=2)	15,9% (n=7)	
II-A	33,3% (n=2)	29,5% (n=13)	
II-B	33,3% (n=2)	36,36% (n=16)	
III-A		9,1% (n=4)	
III-B		9,1% (n=4)	$\chi^2=0,62$; $P>0,70$
Óbito	17% (n=1)	21% (n=9)	
Tempo de Sobrevida (meses)	8	37,22 ± 23,39	
Idade ao Diagnóstico (anos)	62	56,78±11,21	
Pacientes Vivas	83% (n=5)	79% (n=34)	
Tempo de Sobrevida (meses)	54,20 ± 66,45	69,74 ± 42,47	
Idade ao Diagnóstico (anos)	46,80 ± 13,33	57,94 ± 15,82	($t=1,49$; $P>0,10$)

n: número de casos analisados

6.2.1 Tamanho do Tumor

As médias dos tamanhos (em cm) do tumor das pacientes com e sem a mutação R337H *TP53* foram iguais ($3,02 \pm 2,50$ e $3,02 \pm 1,62$, respectivamente) observando-se uma maior dispersão dos valores em torno da média nas pacientes com a mutação (TABELA 3).

A TABELA 3 apresenta a distribuição dos tumores T1, T2 e T3, conforme a classificação TNM, nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*. O teste do Qui ao Quadrado indicou que os mesmos se distribuem igualmente nos dois grupos

de pacientes ($\chi^2_1=0,17$; $P>0,50$) Nesta análise, os tumores T2 e T3 foram considerados em conjunto.

6.2.2 Grau do Tumor

Nas pacientes com a mutação 91% (9/10) e sem a mutação 100% (50/50) foram informativas. Os dados sobre os graus dos tumores estão apresentados no TABELA 3

Nos dois grupos, com e sem a mutação, os tumores com grau II foram os mais frequentemente observados 60% e 50%, respectivamente, enquanto que os de grau I foram os menos frequentes, 10% e 18% dos casos, respectivamente.

O valor do teste do Qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_2=0,49$; $P>0,70$), indicando que os tumores de grau I, II e III se distribuem igualmente entre os dois grupos de pacientes.

6.2.3 Estágio do Tumor

O TABELA 3 apresenta os estágios dos tumores das pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, identificados de acordo com a classificação TNM. Para a análise estatística os tumores 2A e 2B, 3A e 3B, foram agrupados em duas categorias: 2 e 3, respectivamente. Observa-se que nas duas amostras os tumores do estágio 2 foram os mais frequentes e ocorreram, praticamente, com a mesma frequência de 66% (4/6 nas pacientes com a mutação e 29/44 nas pacientes sem a mutação R337H *TP53*) O valor do teste do qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_2=1,98$; $P>0,30$), indicando que os tumores de diferentes estágios se distribuíram igualmente nos dois grupos amostrais.

6.2.4 Metástase

Nas pacientes com a mutação R337H *TP53* 33,3% (3/9) apresentaram metástase em linfonodo, enquanto que no grupo sem a mutação 56% (28/50) das pacientes foram diagnosticadas com metástase em linfonodo. O valor do teste do qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_1=1,57$; $P>0,20$), indicando que as pacientes com e sem metástases em linfonodos se distribuíram igualmente nos dois grupos amostrais (TABELA 3).

6.2.5 Expressão do Receptor de Estrogênio

Nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, 62,5% (5/8) e 80% (40/50), respectivamente, foram positivas para o receptor de estrogênio (RE) (TABELA 3). O valor do teste do Qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_1=1,23$; $P>0,20$), indicando que as pacientes positivas e negativas para RE se distribuíram igualmente nos dois grupos amostrais.

6.2.6 Expressão do Receptor de Progesterona

Nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, 57,1% (4/7) e 84% (42/50), respectivamente, foram positivas para o receptor de progesterona (PR) (TABELA 3). O valor do teste do Qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_1=2,85$; $P>0,05$), indicando que as pacientes positivas e negativas para RP se distribuíram igualmente nos dois grupos amostrais

6.2.7 Expressão da Proteína HER2

Nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, 33,3% (2/6) e 28% (14/50), respectivamente, foram positivas para HER2 (TABELA 3). O valor do teste do Qui ao quadrado não foi estatisticamente significativo ($\chi^2_1=0,06$; $P>0,80$), indicando que as pacientes positivas e negativas para HER2 se distribuíram igualmente nos dois grupos amostrais.

6.2.8 Expressão de Ki67

Nas pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, 100% (4/4) e 83,3% (20/24), respectivamente, foram positivas para Ki67 (TABELA 3). O valor do teste exato de Fisher não foi estatisticamente significativo ($P=1,0$), indicando que o número de pacientes positivas e negativas para Ki67 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos amostrais.

6.2.9 Evolução Clínica

Os dados sobre a evolução clínica das pacientes com e sem a mutação R337H *TP53* são apresentados no TABELA 3. No primeiro grupo, 55% (6/11) das pacientes foram informativas e 86% (43/50) no segundo grupo.

Das pacientes com a mutação 17% (1/6) foi a óbito, sem informação de metástases, aos oito meses após o diagnóstico. Neste grupo 83% (5/6)

permaneciam vivas, três em junho de 2016, sem evidência de doença (SED), e duas na data da última consulta (UC) (3/2011 –SED e 6/2015- com metástase no pâncreas). Estas cinco pacientes apresentaram uma média de sobrevida após o diagnóstico de $54,20 \pm 66,45$ meses (variando de 9 a 166 meses). Ao diagnóstico, a idade, 62 anos, da paciente que foi a óbito foi maior do que a média ($46,80 \pm 13,33$) das idades das cinco pacientes que permaneciam vivas.

Das pacientes sem a mutação, 21% (9/43) foram a óbito e 79% (34/43) permaneciam vivas em junho de 2016 ou na data da última consulta. As nove pacientes que foram a óbito apresentaram metástases: três disseminadas, duas na fossa supra claviclar direita, uma no sistema nervoso central, uma hepática, uma óssea e uma no ovário. Das 34 pacientes vivas, 82% (28/34) permaneciam sem evidência da doença e 18% (6/34) com doença: três com recidiva local, uma com metástases disseminadas, 1 com metástases hepática e uma com metástases óssea. Estas informações são apresentadas no TABELA 3.

As 34 pacientes sem a mutação que permaneciam vivas apresentaram uma sobrevida média de $69,74 \pm 42,47$ meses após o diagnóstico, que foi maior do que a média ($37,22 \pm 23,39$) das nove pacientes sem a mutação que foram a óbito, sendo a diferença estatisticamente significativa ($t=2,20$; $P<0,05$). Foi também maior a da única paciente com a mutação que foi a óbito aos oito meses após o diagnóstico e ainda da média ($54,20 \pm 66,44$) das cinco pacientes com a mutação e que permaneciam vivas, sem, no entanto, que a diferença entre as médias seja estatisticamente significativa ($t=0,78$; $P>0,40$).

As 34 pacientes sem a mutação que permaneciam vivas, apresentaram ao diagnóstico uma idade média de $57,94 \pm 15,82$ anos, semelhante a ($56,78 \pm 11,21$) das nove pacientes sem a mutação que foram a óbito ($t=0,21$; $P>0,80$) e maior do que a ($46,80 \pm 13,33$) das cinco pacientes vivas com a mutação, sem que a diferença tenha sido estatisticamente significativa ($t=1,49$; $P>0,10$). A idade, 62 anos, ao diagnóstico, da única paciente com mutação que foi a óbito, foi maior do que as médias das idades, ao diagnóstico, das pacientes de todos os grupos acima mencionados.

6.3 array-CGH

O método de *array-CGH* foi realizado em amostras de cinco pacientes com a mutação R337H *TP53* e em nove pacientes sem a mutação. Nos APÊNDICES 3 e 4 estão apresentadas as alterações cromossômicas totais (amplificações, ganhos, perdas e deleções), observadas no grupo de pacientes com e sem a mutação, respectivamente. A FIGURA 6 ilustra o perfil genômico, obtido pela técnica de *array-CGH*, da paciente número 5 com a mutação R337H *TP53*.

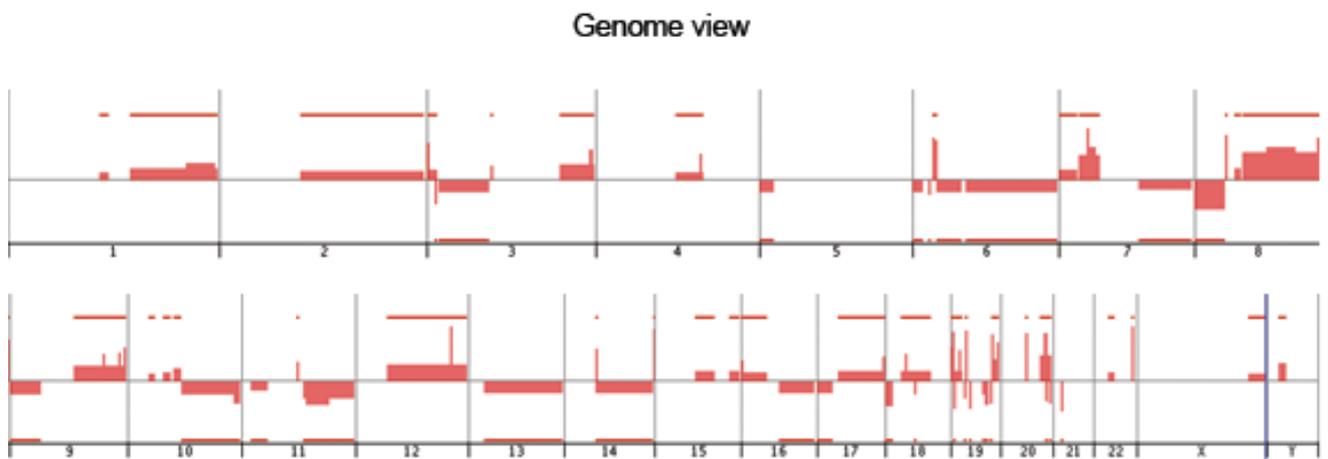


FIGURA 6 - PERFIL GENÔMICO DA PACIENTE COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* Nº 5

Os resultados das alterações cromossômicas **por caso** são apresentados nas TABELAS 4 e 5.

TABELA 4 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR *array-CGH* EM CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H *TP53*, POR CASO

Caso	1				2				3			
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D
TP	7	7	7	0	0	7	21	1	2	8	1	0
%	50	5,38	8,33	0,0	0,0	5,38	25	50	14,29	6,15	1,19	0,0
TG	21				29				11			
%	9,13				12,60				4,78			

Continua

Continuação

Caso	4				5				TOTAL			
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D
TP	1	62	31	0	4	46	24	1	14	130	84	2
%	7,14	4,69	36,90	0,0	38,57	35,38	28,57	50	6,09	56,52	36,52	0,009
TG	94				75				230			
%	40,87				32,6							

C: Caso; AT: Alteração; TP: Total parcial; TG: Total Geral; A: Amplificação; G: Ganho; P: Perda; D: Deleção

As frequências absoluta e relativa, das alterações cromossômicas, por caso, nas cinco pacientes com a mutação R337H *TP53* estão apresentadas na TABELA 4. Foram observadas um total de 230 alterações cromossômicas, com uma média de $46,00 \pm 35,35$ alterações por caso. Os ganhos de cópia de DNA (130) foram as alterações mais frequentes. Considerando as amplificações e os ganhos em uma só classe, denominada de ganhos e as perdas e deleções em uma outra classe, denominada de perdas, observou-se que os ganhos (144) foram mais frequentes do que as perdas (86) com significância estatística ($\chi^2_1=14,62$; $P<0,001$, de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $28,80 \pm 25,82$ e $17,20 \pm 12,66$, respectivamente. Observou-se também que as alterações cromossômicas não se distribuíam ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_4= 23,54$; $P<0,001$), sendo que o caso 8 foi o que apresentou um maior número de alterações cromossômicas, com 63 ganhos e 31 perdas (94-40,87%). O caso 7 apresentou o menor número de alterações com dez ganhos e uma perda (11-4,78%).

TABELA 5 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CASO

C	1				2				3				4				5			
AT	A	G	P	D																
TP	4	22	29	3	2	5	11	0	6	24	5	0	2	23	2	0	1	6	1	0
%	17,39	17,32	56,86	100	8,70	3,94	21,57	0,0	26,09	18,9	9,8	0,0	8,70	18,11	3,92	0,0	4,35	4,72	1,96	0,0
TG	58				18				35				27				8			
%	28,43				8,82				17,16				13,24				3,92			

Continua

Continuação

C	6				7				8				9				TOTAL			
AT	A	G	P	D	A	G	P	D												
TP	2	26	0	0	2	8	1	0	2	13	1	0	2	0	1	0	23	127	51	3
%	8,70	20,47	0,0	0,0	8,70	6,30	1,96	0,0	8,70	10,23	1,96	0,0	8,70	0,0	1,96	0,0	11,27	62,25	25	1,47
TG	28				11				16				3				204			
%	13,73				5,39				7,84				1,47							

C: Caso; AT: Alteração; TP: Total parcial; TG: Total Geral; A: Amplificação; G: Ganho; P: Perda; D: Deleção

As frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas **por caso**, nas nove pacientes sem a mutação R337H *TP53* analisadas estão apresentados na TABELA 5. Foram observadas 204 alterações cromossômicas, com uma média de $22,67 \pm 16,78$ alterações por caso. Os ganhos de cópias de DNA (127) foram as alterações mais frequentes. Considerando as ampliações e os ganhos em uma só classe, denominada de ganhos e as perdas e deleções em outra classe, denominada de perdas, observou-se que os ganhos (150) foram mais frequentes do que as perdas (54) com significância estatística ($\chi^2_1=45,18$; $P<0,001$, de acordo com a proporção esperada de ocorrência ao acaso de 1:1), com um número médio de $16,67 \pm 10,68$ e $6,00 \pm 10,33$, respectivamente. Observou-se também que as alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_8=54,38$; $P<0,001$), sendo que o caso 1 foi o que apresentou um maior número de alterações cromossômicas, com 26 ganhos e 32 perdas (58– 28,43%) e o caso 9 o que apresentou o menor número de alterações com dois ganhos e uma perda (3 – 1,47%).

Os resultados das alterações cromossômicas, por cromossomo, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CROMOSSOMO

CR	1					2					3					4					5					6				
A	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D						
TP	0	9	1	0	0	2	2	0	0	10	6	0	0	4	1	0	0	1	2	0	0	5	9	0						
%	0,0	6,92	1,19	0,0	0,0	1,54	2,38	0,0	0,0	7,69	7,14	0,0	0,0	3,08	1,19	0,0	0,0	0,77	2,38	0,0	0,0	3,85	10,71	0,0						
TG	10					4					16					5					3					14				
%	4,35					1,74					6,96					2,17					1,30					6,09				

Continua

Continuação

CR	7					8					9					10					11					12				
A	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D						
TP	1	8	3	0	3	15	4	0	0	7	3	0	0	4	5	0	3	2	10	0	2	3	0	0						
%	7,14	6,15	3,57	0,0	21,43	11,54	4,76	0,0	0,0	5,38	3,57	0,0	0,0	3,08	5,95	0,0	21,43	1,54	11,9	0,0	14,29	2,31	0,0	0,0						
TG	12					22					10					9					15					5				
%	5,22					9,57					4,35					3,91					6,52					2,17				

Continua

Continuação

CR	13					14					15					16					17					18				
A	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D						
TP	0	0	3	0	0	4	3	1	0	2	0	0	0	4	4	0	2	8	4	0	0	4	4	0						
%	0,0	0,0	3,57	0,0	0,0	3,08	3,57	50	0,0	1,54	0,0	0,0	0,0	3,08	4,76	0,0	14,29	6,15	4,76	0,0	0,0	3,07	4,76	0,0						
TG	3					8					2					8					14					8				
%	1,30					3,48					0,87					3,48					6,09					3,48				

Continua

Continuação

CR	19					20					21					22					X					TOTAL				
A	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D						
TP	1	21	12	1	0	10	4	0	0	1	1	0	2	3	1	0	0	3	2	0	14	130	84	2						
%	7,14	16,15	14,29	50	0,0	7,69	4,76	0,0	0,0	0,77	1,19	0,0	14,29	2,31	1,19	0,0	0,0	2,31	2,38	0,0	6,09	56,52	36,32	0,87						
TG	35					14					2					6					5					230				
%	15,22					6,09					0,87					2,61					2,17									

CR: Cromossomo; AT: Alteração; TP: Total parcial; TG: Total Geral; A: Amplificação; G: Ganho; P: Perda; D: Deleção

As frequências absoluta e relativa, das alterações cromossômicas, **por cromossomo**, nas cinco pacientes com a mutação R337H *TP53* analisadas estão apresentadas na TABELA 6. As ampliações e ganhos foram consideradas em uma única classe (ganhos) e as perdas e deleções em outra (perdas). Observou-se que as 230 alterações encontradas nestas pacientes (média de $10,00 \pm 7,53$ alterações por cromossomo) se distribuíram ao acaso entre os 23 cromossomos analisados ($\chi^2_{22} = 33,75$; $P > 0,05$). O cromossomo com maior número de alterações foi o 19, com 22 ganhos e 13 perdas (35-15,22%) e os cromossomos que tiveram menor número de alterações foram o 15, com 2 ganhos (2-0,87%) e o 21 com 1 ganho e 1 perda (2-0,87%). O número médio de ganhos de cópia de DNA foi igual a $6,26 \pm 5,29$ e o de perdas foi igual a $3,74 \pm 3,22$.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH EM NOVE PACIENTES SEM PARA A MUTAÇÃO R337H TP53, POR CROMOSSOMO

CR	1				2				3				4				5				6						
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D			
TP	0	10	3	0	1	2	0	0	0	2	3	1	0	3	3	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
%	0	7,87	5,88	0	4,35	1,57	0	0	0	1,57	5,88	33,3	0	2,36	5,88	0	0	0,79	1,96	0	0	0,79	0	0	0	0	0
TG	13				3				6				6				2				1						
%	6,37				1,47				2,94				2,94				0,98				0,49						

Continua

Continuação

CR	7				8				9				10				11				12				
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	
TP	1	7	4	0	8	17	4	0	1	7	1	0	0	8	0	0	0	8	4	0	0	1	2	0	0
%	4,35	5,51	7,84	0	34,78	13,39	7,84	0	4,35	5,51	1,96	0	0	6,3	0	0	0	6,3	7,84	0	0	0,79	3,92	0	0
TG	12				29				9				8				12				3				
%	5,88				14,22				4,41				3,92				5,88				1,47				

Continua

Continuação

CR	13				14				15				16				17				18				
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	
TP	0	2	0	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	6	2	0	1	12	10	0	1	5	2	0	0
%	0	1,57	0	0	0	8,66	0	0	0	0,79	0	0	0	4,72	3,92	0	4,35	9,45	19,6	0	4,35	3,94	3,92	0	0
TG	2				11				1				8				23				8				
%	0,98				5,39				0,49				3,92				11,27				3,92				

Continua

Continuação

CR	19				20				21				22				X				TOTAL			
AT	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D	A	G	P	D
TP	0	1	0	0	0	7	0	0	0	9	5	2	10	5	3	0	0	1	4	0	23	127	51	3
%	0	0,79	0	0	0	5,51	0	0	0	7,09	9,80	66,67	43,48	3,94	5,88	0	0	0,79	7,84	0	11,27	62,25	25	1,47
TG	1				7				16				18				5				204			
%	0,49				3,43				7,84				8,82				2,45							

CR: Cromossomo; AT: Alteração; TP: Total parcial; TG: Total Geral; A: Amplificação; G: Ganho; P: Perda; D: Deleção

As frequências absoluta e relativa das alterações cromossômicas, **por cromossomo** nas nove pacientes sem a mutação R337H *TP53* analisadas estão apresentadas na Tabela 7. As ampliações e ganhos foram consideradas numa única classe, denominada de ganhos e as perdas e deleções em outra, denominada de perdas. Observou-se que as 204 alterações encontradas nestas pacientes (média de $8,87 \pm 7,28$ alterações por cromossomo) não se distribuíram ao acaso por cromossomo ($\chi^2_{22} = 40,36$; $P < 0,01$). Os cromossomos com maior número de alterações foram o 8, com 25 ganhos e 4 perdas (29 – 14,22%), e o 17, com 13 ganhos e 10 perdas (23 – 11,27%), sendo que o 8 foi o que apresentou o maior número de ganhos (25-16,67%) e o 17 o maior número de perdas (10-18,52%). Os cromossomos com menor número de alterações foram os 6, 15 e 19 com apenas uma (0,49%) em cada um deles. O número médio de ganhos de cópias de DNA foi igual a $6,52 \pm 5,85$ e o de perdas foi igual a $2,34 \pm 2,55$.

Na TABELA 8 estão resumidas as informações por caso e por cromossomo sobre as médias de ganhos, perdas e do total de alterações cromossômicas, nas pacientes com e sem a mutação R337H TP53.

TABELA 8 – MÉDIA DE GANHOS (n=144 e 150) E PERDAS (n=86 e 54) CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS POR array-CGH, POR CASO E POR CROMOSSOMO NAS PACIENTES COM E SEM A MUTAÇÃO R337H TP53, RESPECTIVAMENTE.

PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53

Alteração	Caso			Cromossomo		
	Ganho	Perda	Total	Ganho	Perda	Total
Média ± DP	28,80 ± 28,82	17,20 ± 12,66	46,00 ± 36,35	6,26 ± 5,29	3,74 ± 3,22	10,00 ± 7,53

Continua

Continuação

PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53

Alteração	Caso			Cromossomo		
	Ganho	Perda	Total	Ganho	Perda	Total
Média ± DP	16,67 ± 10,68	6,00 ± 10,33	22,67 ± 16,78	6,52 ± 5,85	2,34 ± 2,55	8,87 ± 7,28

Observa-se na Tabela 8, que o total das alterações cromossômicas foi, em média, maior nas pacientes com a mutação do que nas sem a mutação, tanto no total geral nos casos como nos cromossomos. No entanto, o procedimento estatístico recomendado para a análise sequencial das diferenças entre as médias é através da análise da variância, que exige, como condição *sine quo non* para aplicá-la, que não haja diferença significativa entre os quadrados médios dos dados amostrais Assim, aplicou-se aos dados acima o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett, obtendo-se os seguintes resultados: Para casos= $\chi^2_{(3),corr}=8,81;P<0,05$ e para cromossomos= $\chi^2_{(3),corr}=19,55;P<0,05$.. Estes resultados indicam que há diferenças significativas entre os quadrados médios, inviabilizando a

análise da variância. Desta forma, avaliamos a significância das diferenças entre as médias, através do teste t de Student, seguindo-se o rigor estatístico que não permite comparações entre todas médias acima apresentadas. Optou-se pela comparação das médias de ganhos, de perdas e do total de alterações cromossômicas tanto em casos, como em cromossomos entre os valores obtidos nas pacientes com e sem a mutação. Os resultados foram os seguintes: 1) Casos: a) ganhos: $t' = 1,00 < t_c = 2,74$, b) perdas - $t = 1,80$; $P > 0,05$ e c) total de alterações - $t = 1,67$; $P > 0,10$; 2) Cromossomos: a) ganhos - $t = 0,16$; $P > 0,80$, b) perdas - $t = 1,63$; $P > 0,10$ e c) total de alterações - $t = 0,52$; $P > 0,60$. Portanto, em nenhuma das comparações a diferença entre as médias foi estatisticamente significativa.

No entanto, quando se comparou a homogeneidade das distribuições de ganhos e perdas nas pacientes com e sem a mutação por um teste não paramétrico, observou-se que as mesmas não se distribuíram igualmente ($\chi^2_1 = 5,90$; $P < 0,05$). As maiores diferenças foram devidas às perdas, tanto nas pacientes com a mutação ($O = 86$, $E = 74,19$) como nas pacientes sem a mutação ($O = 54$, $E = 65,81$). Identifica-se que os valores observados (O) e esperados (E) apresentaram-se em sentido contrário com os valores dos χ^2 parciais, respectivamente iguais a 1,88 e 2,12, representando em conjunto 67% do valor do χ^2 total ($3,98/5,90 = 0,67$).

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer em mulheres, representando, no ano da última estimativa, em 2012, cerca de 25% de novos casos diagnosticados, em todo o mundo (GLOBOCAN, 2012). Apesar do avanço no tratamento da doença ter reduzido significativamente os casos de morte em decorrência da doença, mais de 521 mil mortes são estimadas anualmente em todo o mundo (GHONCHEN *et al.*, 2016). Este cenário pode ser explicado no contexto da complexa heterogeneidade biológica do câncer de mama, além de condições socioeconômicas, que impedem ou dificultam as classes sociais menos favorecidas ao acesso a prevenção e ou a cuidados terapêuticos mais efetivos (ROBERT *et al.*, 2004; PRAT *et al.*, 2015).

Além de suas importantes funções regulatórias no ciclo celular e na apoptose em respostas a danos ao DNA, a proteína p53 atua para impedir o desenvolvimento da carcinogênese, promovendo, por exemplo, a estabilidade genômica, controlando a resposta imune e a inflamação no tumor e exercendo efeito antiangiogênico (BERTHEAU *et al.*, 2013).

O gene *TP53* aparece mutado em aproximadamente 50% de todos os casos de câncer, e em 30% dos casos de câncer de mama, apresentando cerca de 30.500 diferentes tipos de mutações, incluindo somáticas e germinativas (IARC,2016). Desta forma, um melhor conhecimento destas mutações resultará numa efetiva contribuição para um melhor entendimento da carcinogênese mamária humana.

A mutação R337H *TP53* foi identificada pela primeira vez no Brasil, por Ribeiro e colaboradores (2001). Neste estudo, foi observada a associação da referida mutação com tumor de córtex adrenal em 35 pacientes pediátricos, em um total de 36 indivíduos analisados. Em estudos prévios (SANDRINI *et al.*, 1997), já era conhecido que a incidência do tumor de córtex adrenal era cerca de 10 a 15 vezes maior no Sul do Brasil do que em outras regiões do mundo, porém não se conhecia nenhum fator genético associado a essa observação.

Pinto e colaboradores (2004) analisando dois *loci* polimórficos intragênicos no braço curto do cromossomo 17 (VNTRp53 e p53CA) encontraram forte evidência de co-segregação entre os dois *loci* polimórficos intragênicos e a mutação R337H *TP53*, sugerindo que esta mutação teve origem em um ancestral comum na maioria dos

pacientes diagnosticados com TCA no Sul e Sudeste do Brasil. Em estudo posterior, a hipótese de fundador comum foi avaliada também por Garritano e colaboradores (2009), em pacientes provenientes do Sul e Sudeste do Brasil e de uma família de Portugal, utilizando 29 tag SNPs do gene *TP53*, sendo observada a ocorrência de um mesmo haplótipo em todos os indivíduos analisados. No entanto, Hermann e colaboradores (2011) identificaram a ocorrência de um haplótipo diferente daquele encontrado por Garritano e colaboradores (2009), em um paciente alemão adulto diagnosticado com carcinoma adrenocortical.

Nos anos subsequentes às informações iniciais sobre a mutação R337H *TP53* observou-se a ocorrência de outros tipos de câncer em portadores da referida mutação, como: carcinoma de plexo coróide, câncer de cólon, de estômago, de tireóide, osteossarcoma, neuroblastoma e câncer de mama (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008; SEIDINGER *et al.*, 2011a, b, 2015; GOMES *et al.*, 2012; CUSTÓDIO *et al.*, 2013; GIACOMAZZI *et al.*, 2014). A mutação R337H *TP53* também foi identificada em famílias brasileiras que preenchem os critérios para a SLF, onde foi observado, em alguns casos, idade tardia de diagnóstico, variação no espectro tumoral com aparecimento de tumores de papila duodenal e Ampola de Vater, nunca antes observados no espectro da SLF (ACHATZ *et al.*, 2007).

Após o rastreamento de 171.649 recém-natos do Estado do Paraná quanto à presença da mutação R337H *TP53*, no período de 2005 a 2010, foram identificados 461 com a mutação, estabelecendo em 0,27% sua frequência populacional. Após a identificação dos indivíduos portadores da mutação, iniciou-se a avaliação das respectivas famílias destes indivíduos. Foram encontrados outros tipos de câncer nas famílias que apresentavam a mutação; sendo o câncer de mama o mais frequente em indivíduos em idade adulta (CUSTÓDIO *et al.*, 2013).

Neste contexto, ressalta-se a importância da compreensão da mutação R337H *TP53* na carcinogênese mamária, bem como um melhor entendimento da associação da mutação com os fatores clínico-histopatológicos das pacientes diagnosticadas com câncer de mama, e da instabilidade genômica relacionada com esta mutação, levando em consideração o importante papel que a proteína p53 desempenha na manutenção da estabilidade genômica.

No presente trabalho, em uma amostra de 700 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, atendidas nos Hospitais Nossa Senhora das Graças e de Clínicas da cidade de Curitiba, Paraná, 11 foram identificadas como heterozigotas para a mutação R337H *TP53*, com uma frequência alélica de 0,79% e genotípica de 1,57%. O fato da mutação ter aparecido em condição de heterozigose pode sugerir que nesses tumores a perda do alelo selvagem comumente observada em tumores adrenocorticais não foi evidente. Naturalmente não podemos excluir a possibilidade de contaminação com tecido normal nesses tumores. Estas frequências são maiores do que a observada por Palmero e colaboradores (2008) em uma amostra de 750 mulheres da população de Porto Alegre, RS, consideradas saudáveis e submetidas a mamografia em exames de rotina. Nesta amostra, os autores detectaram duas mulheres com a mutação, o que representou uma frequência genotípica de 0,27%. A mesma frequência genotípica foi descrita por Custódio e colaboradores (2013) analisando 171.649 recém-natos do Estado do Paraná. Portanto, a frequência encontrada neste trabalho, nas pacientes portadoras de carcinomas mamários, (aproximadamente 1,6%) é 5,93 vezes maior do que a descrita pelos autores acima mencionados (aproximadamente 0,27%), representando apenas 16,8% de 1,6%. Como nos trabalhos citados os procedimentos metodológicos foram semelhantes, a diferença detectada não pode ser atribuída aos mesmos e nem ao acaso, conforme o resultado do teste aplicado. Este resultado deve-se então, a maior frequência da mutação R337H *TP53* nas pacientes portadoras de carcinomas mamários.

A frequência da mutação R337H *TP53* foi também avaliada por Giacomazzi e colaboradores (2014) em pacientes diagnosticadas com câncer de mama atendidas em três Instituições Médicas: Hospital de Clínicas da cidade de Porto Alegre (RS), Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo (SP), e Hospital do Câncer de Barretos (SP), em dois grupos de pacientes portadoras de câncer de mama, sendo: (1) 59 mulheres com histórico familiar sugestivo para câncer hereditário, porém sem preencher os critérios para as SLF ou SLF *like* e (2) 815 mulheres diagnosticadas com câncer antes dos 45 anos ou aos 55 anos ou mais sem histórico familiar de câncer. As frequências genotípicas encontradas nos grupos 1 e 2 foram 3,4% e 8,6%, respectivamente. No trabalho realizado por Gomes e colaboradores (2012), a frequência da mutação foi avaliada em 390 pacientes diagnosticadas com câncer de mama na cidade do Rio de Janeiro. Foram encontradas duas pacientes portadoras

da mutação R337H *TP53*, sendo a frequência genotípica 0,5% e a alélica 0,25%. As diferenças encontradas nos estudos já realizados em comparação com este trabalho, provavelmente não se devem, à diferenças metodológicas, porém possivelmente resultam de diferenças amostrais e das diferentes regiões geográficas do país, onde as amostras foram coletadas. No trabalho de Giacomazzi e colaboradores (2014), um dos grupos amostrais era de pacientes com histórico familiar de câncer de mama e o outro grupo, com a inclusão de pacientes com idade inferior a 45 anos ao diagnóstico, resultou na seleção de pacientes de maior risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Isto pode ter influenciado na alta frequência genotípica da mutação encontrada pelos autores. No presente trabalho, foram selecionadas todas as pacientes diagnosticadas com câncer de mama e com material disponível para análise, sem seleção de idade do diagnóstico ou do histórico familiar.

Em relação à média de idade dos dois grupos de pacientes analisados, as onze pacientes heterozigotas para a mutação R337H *TP53* apresentaram uma média de idade inferior ($46,54 \pm 14,53$ anos) tanto em relação à amostra total de 689 pacientes que não apresentaram a mutação ($55,47 \pm 14,96$ anos) como na subamostra de 50 pacientes, sem a mutação, selecionadas para as comparações clínico-histopatológicas ($58,52 \pm 15,18$ anos). Em ambas as comparações as diferenças foram estatisticamente significativas ($t=1,97$; $P<0,05$ para a amostra com 689 pacientes e $t=2,39$; $P<0,05$ para a subamostra com 50 pacientes). Giacomazzi e colaboradores (2014), anteriormente citados neste trabalho, observaram que a mutação R337H *TP53* foi mais frequente nas pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 45 anos de idade (12,1%) do que em pacientes diagnosticadas após os 55 anos de idade (5,1%). Mais recentemente, Andrade e colaboradores (2016) avaliando três famílias que não preenchiam os critérios de inclusão para as SLF ou SLF-*like*, observaram, nas três famílias, a ocorrência de indivíduo probando diagnosticado com câncer de mama antes dos 45 anos de idade. A partir de estudos que avaliaram pacientes diagnosticadas com câncer de mama e portadoras de mutações germinativas no gene *TP53*, observou-se que existe uma associação entre estas mutações germinativas e idade precoce (<30 anos) de diagnóstico, independentemente de histórico familiar de câncer (McCUAIG *et al.*, 2012; RATH *et al.*, 2013). Portanto, os nossos dados concordam com os descritos acima, indicando

a importância da mutação R337H *TP53* no desenvolvimento precoce do câncer de mama.

Considerando que o conhecimento sobre a contribuição da mutação R337H *TP53* para o processo de carcinogênese mamária é ainda limitado, analisamos a presença da mutação, nos dois grupos de pacientes (11 com a mutação e 50 sem a mutação) em relação aos seguintes parâmetros clínico-histopatológicos: tamanho, grau, expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e expressão da proteína HER2. Os resultados estatísticos, obtidos pelos testes do qui ao quadrado e *t*, não indicaram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados. No entanto, estes resultados devem ser avaliados com cautela já que o tamanho da amostra das pacientes com a mutação é pequeno (veja Resultados) não permitindo interpretações com maior consistência. Apesar desta importante restrição, a obtenção de informações sobre os parâmetros clínico-histopatológicos em pacientes com câncer de mama com a mutação R337H *TP53* devem ser obtidas e analisadas, uma vez que a associação de mutações germinativas no gene *TP53* e o prognóstico no câncer de mama, ainda são conflitantes (DAMINENI *et al.*, 2014; SILWAL-PANDIT *et al.*, 2014).

Neste mesmo contexto, Fitarelli-Kiehl e colaboradores (2015) analisaram a expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e da proteína HER2 em 66 pacientes diagnosticadas com câncer de mama com a mutação R337H *TP53* e em 12 paciente, também diagnosticadas com câncer de mama, com mutações germinativas no domínio central de ligação ao DNA do gene *TP53*. Os autores observaram que 22,7% das pacientes com a mutação R337H apresentavam a super expressão da proteína HER2 (HER2+), enquanto 75% das pacientes com mutações no domínio central de ligação ao DNA apresentavam a super expressão da proteína HER2. A partir destas observações, os autores sugerem que as diferentes mutações no gene *TP53* levam à predisposição ao câncer de mama através de diferentes mecanismos.

Uma das características da progressão tumoral é o aumento gradual da instabilidade genômica, manifestado desde frequências mais elevadas de mutações gênicas até alterações significativas no número e na estrutura dos cromossomos (OREN & ROTTER, 2010). O aumento da instabilidade genômica em células de tumores está relacionado com formas mutadas da proteína p53, que desregulando

os pontos de checagem do fuso celular originam poliploidias (GUALBERTO *et al.*, 1998). Pela análise *in vivo* da expressão do domínio de ligação ao DNA do gene *TP53*, observou-se o desenvolvimento de tumores com alto grau de instabilidade genômica, manifestado por aneuploidias, ampliações do centrôssomo e translocações não recíprocas (HINGORANI *et al.*, 2005; CAULIN *et al.*, 2007).

Neste contexto, a instabilidade genômica foi avaliada, pelo método de *array-CGH*, em cinco pacientes com a mutação R337H *TP53* e em nove pacientes sem a mutação, em pacientes diagnosticadas com câncer de mama. A comparação das médias de ganhos, de perdas e do total de alterações, por caso e por cromossomo, entre os grupos de pacientes, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias, indicando que não houve diferença na instabilidade genômica entre os dois grupos. Observe-se que o resultado que apresentamos foi obtido pela comparação das diferenças e entre as médias do número de ganhos, de perdas e do total de alterações nos dois grupos de pacientes. No entanto quando se analisou a homogeneidade das distribuições de ganhos e de perdas nas pacientes com e sem a mutação, diferença estatisticamente significativa foi observada ($\chi^2_1 = 5,90$; $P < 0,05$) e um dos principais valores responsáveis pela diferença, foi o excesso, relativamente ao esperado, de perdas nas pacientes com a mutação, identificando-se, também relativamente ao esperado, um menor número de ganhos nas mesmas pacientes. Portanto, é possível que a instabilidade se manifeste não pela média do tipo de alterações (ganhos e perdas), mas pela distribuição das mesmas nas pacientes com e sem a mutação.

Como já citado anteriormente neste trabalho, mutações localizadas no domínio de ligação ao DNA do gene *TP53*, apresentam o maior número de mutações e, por isso, esta região é denominada “*hotspot*” do gene. Nesta região, muitas mutações apresentam ganhos de função (GOF) ao invés de apresentarem perda de função (LOF). Neste tipo de situação (GOF), a proteína p53 mutada passa a apresentar funções oncogênicas, induzindo mecanismos anti-apoptóticos e invasão e metástase (OREN & ROTTER, 2010). Um exemplo de ganho de função foi apresentado por Murphy e colaboradores (2000), que demonstraram aumento da instabilidade genômica em células epiteliais mamárias com a mutação R172H, localizada na região *hotspot* do gene *TP53*.

Lányi e colaboradores (1998) apresentaram informações sugestivas de que proteínas p53 mutantes eram dependentes das regiões de oligodimerização e regulação do gene *TP53* para adquirir ganhos de função oncogênicas. Desta forma, levando em consideração que a mutação R337H *TP53* está localizada na região de oligodimerização do gene *TP53*, pode-se supor que não seja observado ganho de função pela proteína p53-R337H, uma vez que a região de oligodimerização está alterada. Não foram encontradas informações disponíveis referentes ao ganho de função da proteína p53-R337H no banco de dados “*UMD TP53 MUTATION DATABASE*”.

Em resumo, a diferença estatisticamente não significativa da instabilidade genômica, observada neste trabalho, entre as pacientes com e sem a mutação R337H *TP53*, pode ser devido à ausência de ganho de função pela proteína p53-R337H em pacientes com câncer de mama.

A variação do número de cópias (CNV) de pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* foi avaliada por Silva e colaboradores (2012), pelo método do array-CGH, em pacientes com histórico familiar para as SLF ou SLF-like com diversos tipos de câncer, incluindo: sarcoma de tecidos moles, câncer de mama, rim, pulmão. Os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo: (1) com mutação no domínio central de ligação ao DNA; (2) com mutação no domínio de oligodimerização; (3) pacientes sem mutação no gene *TP53*. Não foram observadas diferenças significativas na frequência de CNV entre os pacientes, incluindo as portadoras da mutação R337H e do domínio central de ligação ao DNA, e controles. Porém, observou-se um aumento de CNVs raras em pacientes com mutações no domínio de ligação ao DNA, em relação aos controles e aos portadores da mutação R337H. Não foram observadas CNVs raras no grupo de pacientes portadores da mutação R337H, o que pode estar relacionado, segundo os autores, a uma menor predisposição à formação de tumores da mutação. Neste trabalho de Silva e colaboradores (2012), foram consideradas CNVs raras aquelas que nunca tinham sido reportadas, ou tinham sido reportadas somente uma vez, no banco de dados “*Database of Genomic Variants*”.

No trabalho de Silva e colaboradores (2012), entre os pacientes com a mutação R337H (n=12), nove foram diagnosticadas com câncer de mama. Ao comparar as alterações descritas no trabalho de Silva e colaboradores (2012) e as

encontradas neste trabalho, não foi observada nenhuma alteração em comum. Este fato pode ser devido a diferenças metodológicas: Neste trabalho, o genoma referência utilizado no *array*-CGH foi o hg19, e no trabalho de Silva e colaboradores (2012) foi o hg18, que identificam diferentes coordenadas genômicas.

Letouzé e colaboradores (2012) analisaram as alterações genômicas de 13 pacientes brasileiros, com a mutação R337H *TP53*, e 12 de outras localizações geográficas, diagnosticados com TCA, utilizando a técnica de alta resolução SNP-array. A partir da análise de ganhos e perdas de DNA, os autores observaram similaridade entre os tumores de pacientes brasileiras e de pacientes de outras localizações com mutações no gene *TP53*. Entretanto, tumores de pacientes sem mutações em *TP53* apresentavam perfil genômico diferente e menos alterações, comparada com os outros grupos. Foi observado pelos autores, que entre os grupos de pacientes com mutações no gene *TP53*, três alterações são mais frequentes: LOH do cromossomo 17, +9q33-q34 e -4q34.

Conforme já mencionado, o estudo de famílias portadoras da mutação R337H *TP53* resultou em um cenário diverso de casos de câncer: foi observada a associação da mutação com o TCA em famílias que não se enquadravam nos critérios da SLF ou SLF-*like* (RIBEIRO *et al.*, 2001). Figueiredo e colaboradores (2006), estudaram famílias portadoras da mutação R337H *TP53* e 24% delas se enquadravam nos critérios da SLF-*like*. Achatz e colaboradores (2007), identificaram sete famílias portadoras da mutação R337H *TP53* que podem ser classificadas nos critérios da SLF- *like* que apresentaram indivíduos portadores de câncer de mama e outros tumores em idade precoce. Uma família portadora da mutação foi descrita com dois indivíduos em idade avançada (77 e 93 anos) e assintomáticos (ACHATZ, 2008)

Considerando o que foi descrito acima, é possível que modificadores genéticos atuem em conjunto com a mutação R337H *TP53*, determinando ou contribuindo para que a perda de atividade da proteína p53 esteja envolvida com um risco aumentado de desenvolver TCA e outros tumores, como o de mama (ZAMBETTI, 2007; ACHATZ,2008).

Com o objetivo de avaliar a heterogeneidade de riscos nos casos de câncer com a mutação R337H *TP53*, Sagne e colaboradores (2014), analisaram se

polimorfismos no gene *TP53* estavam associados com as diferenças na idade de diagnóstico do tumor primário em famílias que se enquadravam nos critérios das SLF ou SLF-*like*. Entre os 402 indivíduos analisados, 70 apresentavam a mutação R337H *TP53*. Desta forma, os autores assumiram que todos os portadores da mutação R337H *TP53* apresentavam o mesmo alelo mutado, considerando a homogeneidade de haplótipos. No entanto, o alelo selvagem poderia apresentar diferentes SNPs que poderiam alterar a função da proteína p53 mutada, e por fim, no risco do tipo de câncer desenvolvido. Foi identificado um polimorfismo de repetição de 16pb no *íntron 3* do gene *TP53* que mostrou diferença significativa com a idade de diagnóstico do tumor primário em portadores da mutação R337H: portadores da mutação R337H e do alelo selvagem contendo uma cópia do motivo de 16pb, desenvolveram tumores na infância, incluindo o TCA. Os portadores da mutação e do alelo selvagem com duas cópias do motivo de 16pb desenvolveram tumores apenas na idade adulta, sem TCA. Sugeriu-se que este polimorfismo atue no alelo selvagem em portadores da mutação R337H *TP53*, resultando em diferentes níveis de haploinsuficiência, dependendo da natureza do alelo selvagem.

Além de polimorfismos, outros eventos podem estar envolvidos na cooperação com a mutação R337H *TP53* no processo de tumorigênese. Em um sequenciamento completo do genoma de pacientes brasileiros diagnosticados com TCA portadores da mutação, observou-se grande variabilidade no nível de instabilidade genômica desde pouca a mais significativa. Nas amostras que apresentaram maior instabilidade genômica, observou-se a ocorrência de mutações somáticas no gene *ATRX*, que codifica uma helicase que participa do processo de remodelamento da cromatina e manutenção do telômero. (PINTO *et al.*, 2015).

De acordo com o que acima foi descrito pode-se admitir que pouco ainda se sabe sobre a contribuição da mutação R337H *TP53* no processo de carcinogênese mamária. Assim, análises de sequenciamento completo de genoma de pacientes portadores da mutação e ensaios funcionais em modelos *in vitro* e *in vivo*, podem contribuir de forma consistente para o conhecimento de novos modificadores genéticos que atuem em conjunto com a mutação R337H *TP53*.

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho permitem ressaltar:

1) A importância da mutação R337H *TP53* em pacientes diagnosticadas com câncer de mama, independentemente de histórico familiar, considerando que a frequência genotípica (1,6%) observada nesta amostra foi 5,93 vezes maior do que a frequência genotípica (0,27%) descrita por Custódio *et al.*, (2013) em uma análise de 171.649 recém-nascidos do Estado do Paraná;

2) A menor média de idade ao diagnóstico com diferença estatisticamente significativa, das pacientes com a mutação R337H *TP53* do que das pacientes sem a mutação (2014), o que pode ser relevante para o desenvolvimento precoce do câncer de mama;

Estas duas informações podem ser de interesse pela sua aplicabilidade no Aconselhamento Genético

3) Na amostra de pacientes com a mutação R337H *TP53* analisadas, não foi encontrada associação com os parâmetros clínicos histopatológicos analisados. Este fato pode estar relacionado com o pequeno número amostral de pacientes com a mutação que apresentavam as informações clínico histopatológicas, ou ao fato da mutação R337H *TP53* não contribuir significativamente para o prognóstico das pacientes;

4) Embora as alterações genômicas, detectadas por *array*-CGH, terem sido em média, em geral, maiores nas pacientes com a mutação do que nas sem a mutação em nenhuma das alterações analisadas (perdas, ganhos e no total) tanto em casos como em cromossomos, as diferenças não foram estatisticamente significativas, indicando que a presença da mutação R337H *TP53* não está associada ao aumento da instabilidade genômica em pacientes portadoras de câncer de mama. No entanto, quando a homogeneidade dos dois tipos de distribuições (ganhos e perdas) foram analisados nos dois grupos de pacientes, diferença estatisticamente significativa foi observada, sugerindo que a conclusão sobre a não instabilidade genômica necessita ser avaliada pela análise de outras amostras e, provavelmente, em um maior número de pacientes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI TAMIMI, DM; SHAWARBY, MA; AHMED, A; HASSAN, AK; AIODAINI, AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer-- a Saudi population based study. **BMC Cancer**, 2010.

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

ACHATZ, MI. Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene *TP53* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumenilike: impacto dos polimorfismos intragênicos do *TP53* e de genes que regulam a atividade da p53. **Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.**

ACHATZ, MI; ZAMBETTI, GP. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2016

ADORNO, M. et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. **Cell**.137(1):87-98, 2009

AMENDOLA, L.C.B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n° 4, p.325-330, 2005.

ANDRADE, KC. et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation. **Genet Mol Biol**. 24;39(2):199-202, 2016

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

BALMAIN, A; GRAY, J; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nat Genet**.33 Suppl:238-44, 2003.

BATEMAN, AC. Breast pathology. **Surgery**. 25(6):245-250, 2007

BAYLIN, SB; JONES, PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer** 23;11(10):726-34, 2011.

BERGER, SL; KOUZARIDES, T; SHIEKHATTAR, R; SHILARIFORD, A. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev**.1;23(7):781-3, 2009.

BERTHEAU, P. et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **Breast** ;22 Suppl 2:S27-9, 2013

BEWICK, V; CHEEK, L; BALL, J. Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. **Crit Care**. 8(6):508-12, 2004

BIEGING, KT; MELLO, SS; ATTARDI, LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat Rev Cancer**.14(5):359-70, 2014.

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

BOCKMEYER, CL. et al. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. **Breast Cancer Res Treat.** 130(3):735-45, 2011

BORGES, LM; AYRES, FM. R337H mutation of the TP53 gene as a clinical marker in cancer patients: a systematic review of literature. **Genet Mol Res.** 14(4), 2015.

BØRRESEN, AL. et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. **Cancer Res.** Jun 1;52(11):3234-6, 1992.

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. **J Med Genet.** Apr;38(4):253-7, 2001.

BRAITHWAITE, AW; PRIVES CL. p53: more research and more questions. **Cell Death Differ.**13(6):877-80, 2006.

BROSH, R; ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. **Nat Rev Cancer.**(10):701-13,2009.

CANCER RESEARCH UK. TNM Breast Cancer Staging. Disponível em > <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/treatment/tnm-breast-cancer-staging> < (Acesso em Setembro de 2016)

CAULIN, C. et al. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. **J Clin Invest.** 117(7):1893-901, 2007

CHA, YJ. et al. The Clinicopathologic Features of Molecular Apocrine Breast Cancer. **Korean J Pathol.** 46(2): 169–176, 2012

CORADINI, D. et al. TP53 mutation, epithelial-mesenchymal transition, and stemlike features in breast cancer subtypes. **J Biomed Biotechnol**, 2012

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**

CUSTÓDIO, G. et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol.** 31(20):2619-26, 2013

DAMINENI, S. et al. Germline mutations of TP53 gene in breast cancer. **Tumour Biol.** 35(9):9219-27, 2014

DENOIX PF. Tumor, Node and Metastasis (TNM). **Bull Inst. Nat Hyg (Paris)** 7:743, 1952

DiGiammarino, EL. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol.** 9(1):12-6, 2002

DIMITRIO, L; CLAIRAMBAULT, J; NATALINI, R. A spatial physiological model for p53 intracellular dynamics. **J Theor Biol.** 316:9-24, 2013

DUMAY, A. et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. **Int J Cancer**. 132(5):1227-31, 2013

ELLIS, M; PEROU, CM. The Genomic Landscape of Breast Cancer as a Therapeutic Roadmap. **Cancer Discov**. 3(1): 27–34, 2013

ELSTON, CW; ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**. 19(5):403-10, 1991

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**. 38(6):698-707, 2012

FANG, F. et al. Breast Cancer Methylomes Establish an Epigenomic Foundation for Metastasis. **Sci. Transl. Med**. 3, 75ra25, 2011

FIGUEIREDO, BC. et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline *TP53* R337H mutation. **J. Med. Genet**. 43: 91-96, 2006.

FINLAY, CA; HINDS, PW; LEVINE, AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**. 57(7):1083-93, 1989.

FITARELLI-KIEHL, M. et al. The breast cancer immunophenotype of TP53-p.R337H carriers is different from that observed among other pathogenic TP53 mutation carriers. **Familial Cancer**. 14:333–336, 2015

FORD, NA. et al. Obesity, independent of p53 gene dosage, promotes mammary tumor progression and upregulates the p53 regulator microRNA-504. **PLoS One.** 28;8(6), 2013

FUNK, W. D. et al. A transcriptionally active DNA binding site for human p53 protein complexes. **Mol Cell Biol, Dallas,** 12,(6), 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. **Hum Mutat.**31(2):143-50, 2010.

GENETICS HOME REFERENCE. Disponível em < <https://ghr.nlm.nih.gov/>> Acesso em Setembro de 2016

GHONCHEN, M; POURNAMDAR, Z; SALEHINIHYA, H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. **Asian Pac J Cancer Prev.** 17 Spec No:43-6, 2016

GOH, JN. et al. microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. **Biol Rev Camb Philos Soc.** 91(2):409-28, 2015

GOMES, MC. et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. **Hered Cancer Clin Pract.** 28;10(1):3, 2012.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS One.**17;9(6), 2014.

GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em > http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx < (Acesso em Setembro de 2016)

GRUVBERGER, S. et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. **Cancer Res.** 61(16):5979-84, 2001

GUALBERTO, A. et al. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95(9):5166-71, 1998

HAMILTON L. et al. Ultrasound diagnosis of fibroadenoma--is biopsy always necessary? **Clin Radiol.**63(9), 2008.

HANAHAN, D; WEINBERG, RA. **The hallmarks of cancer.** Cell. 7;100(1):57-70, 2000.

HAYNES, K. et al. Cancer incidence in The Health Improvement Network. **Pharmacoepidemiol Drug Saf.**18(8):730-6, 2009.

HERRMANN, LJ. et al. TP53 germline mutation in adult patients with adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 97: E476-E485, 2012

HINGORANI, SR. et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. **Cancer Cell.** 7(5):469-83, 2005

HOLM, K. et al. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. **Breast Cancer Res.**;12(3):R36, 2010.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Database (2016). Disponível em > <http://p53.iarc.fr/p53Sequences.aspx>< (Acesso em Setembro de 2016.)

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2016. (Acesso em Setembro de 2016)

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Controle do Câncer de Mama: Documento Consenso, 2004. Disponível em: > <http://www.inca.gov.br/publicacoes/consensointegra.pdf> < (Acesso em Setembro de 2016)

JACKS, T. et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. **Curr Biol, Cambridge**, 4, (1) ,1-7, 1994.

JOERGER, AC; FERSHT, AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. **Annu Rev Biochem.** 77:557-82, 2008

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.**61(2):69-90, 2011.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics, 2010. **CA Cancer J Clin.** v. 60, n° 5, p. 1-24, 2010.

KAMADA, R. et al. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. **Biopolymers**. 106(4):598-612, 2016

KAMIHARA, J. et al. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat**. 35(6):654-62, 2014

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**.502(7471):333-9, 2013.

KIM, MP; ZHANG, Y; LOZANO, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. **Front Oncol**. 5:249, 2015.

KNUDSON, AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA**. 68(4):820-3, 1971

KOPNIN, BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc)**. 65(1):2-27, 2000

LÁNYI, A. et al. 'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. **Oncogene**. 16(24):3169-76, 1998

LEGAL, EF. et al. Prevalence of an inherited cancer predisposition syndrome associated with the germ line TP53 R337H mutation in Paraguay. **Cancer Epidemiol**.(2)166-9, 2015.

LETOUZÉ, E. et al. SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. **J Clin Endocrinol Metab.** 97(7), 2012

LEVINE, AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell.** 88(3):323-31, 1997.

LI, J; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene.** 27, 6194–6206, 2008.

LI, FP, FRAUMENI, JF Jr. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 48:5358–5362,1988

LI, J. et al. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol.** 8(7):8500-8505, 2015

LI, ZH. et al. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. **Oncotarget,** 2016

LIFE TECHNOLOGIES. TaqMan® SNP Genotyping Assays, 2014. Disponível em >http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042998.pdf < (Acesso em Setembro de 2016)

LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature,** 462:315e322, 2009.

LIU, Y. et al. miR-375 targets the p53 gene to regulate cellular response to ionizing radiation and etoposide in gastric cancer cells. **DNA Repair (Amst)**. 12(9):741-50, 2013

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clin Med Insights Pathol**. 8: 23–31, 2015

MALKIN, D. Li-fraumeni syndrome. **Genes Cancer**. (4):475-84, 2011.

McBRIDE, OW; MERRY, D; GIVOL, D; The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). **Proc Natl Acad Sci U S A**. 83(1):130-4, 1986.

McCUAIG, JM. et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? **Fam Cancer**. 11(4):607-13, 2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer de mama: é preciso falar disso / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: Inca, 2014.

MULLER, PA; VOUSDEN, KH. p53 mutations in cancer. **Nat Cell Biol**.(1):2-8, 2013.

MURPHY, KL; DENNIS, AP; ROSEN, JM. A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. **FASEB J** 14: 2291–2302, 2000

NOWELL, PC; HUNGERFORD, DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leucemia. **Science**. 142:1497,1960

NOWELL, PC. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**. 1;194(4260):23-8, 1976.

NUSSBAUM LR, McLNNES RR, WILLARD FH. **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 7th ed. Saunders; 2007.

OCHS-BALCOM, HM. et al. Adiposity is associated with p53 gene mutations in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 153(3):635-45, 2015

OLIVIER, M. et al. *TP53* Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2(1), 2010

OLIVEIRA, AM; ROSS, JS; FLETCHER, JA. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **Am J Clin Pathol**.124 Suppl:S16-28, 2005.

OREN, M; ROTTER, V. Introduction: p53--the first twenty years. **Cell Mol Life Sci**. 55(1):9-11, 1999

OREN, M; ROTTER, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2(2), 2010

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

PALMERO, EL. et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett.** 261(1):21-5, 2008

PEROU, CM. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** 17;406(6797):747-52, 2000.

PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene.**26(15):2157-65, 2007.

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

PINTO, EM. et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nature Communications**, 6;6:630, 2015

POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **J Clin Invest.**121(10):3786-8, 2011.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest.** 117(11):3155-63, 2007

PRAT, A. et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. **BMC Med.** 18;13:303, 2015

RATH, MG. et al. Prevalence of germline TP53 mutations in HER2+ breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat.** 139(1):193-8, 2013

REIS-FILHO, JS; PUSTZAI L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**. 19;378(9805):1812-23, 2011

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

RIBEIRO, RC. et al. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. **Cancer Lett**. 18;247(2):353-5, 2007

ROBERT, SA. et al. Socioeconomic risk factors for breast cancer: distinguishing individual- and community-level effects. **Epidemiology**, 15(4):442-50, 2004

ROSAI, J. **Rosai and Ackerman's Surgical Pathology**.10 ed. Elsevier/Mosby, 2011.

ROSMAWATI, NH. Knowledge, attitudes and practice of breast self-examination among women in a suburban area in Terengganu, Malaysia. **Asian Pac J Cancer Prev**.11(6):1503-8, 2010.

ROSSNER, P Jr. et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. **J Cell Mol Med**.(9B):3847-57, 2009.

ROWLEY,JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, 1;243(5405):290-3, 1973.

SAGNE, C. et al. Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures. **Carcinogenesis**. 35(4):807-15, 2014

SANDRINI, R; RIBEIRO, RC; DeLACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**. 82(7):2027-31, 1997

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 74(12):5463-7, 1977

SEIDINGER, AL. et al. Association of the highly prevalent *TP53* R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer**. 117(10):2228-35, 2011

SEIDINGER, AL. et al. Occurrence of Neuroblastoma among *TP53* p.R337H Carriers. **PLoS One**.10(10), 2015.

SILVA, AG. et al. Number of rare germline CNVs and TP53 mutation types. **Orphanet J Rare Dis**. 21;7:101, 2012

SIWAL-PANDIT, L. et al. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. **Clin Cancer Res**. 20(13):3569-80, 2014.

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

SOARES, EWS et al, 2016. **Comunicação pessoal**

SORLIE,T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **PNAS**. 98(18),2001

SORLIE,T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 100(14):8418-23, 2003

STEPHENS,PJ et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. **Nature**, 24;462(7276), 2009.

STURZBECHER, HW. et al. A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. **Oncogene**. 7(8):1513-23, 1992.

TANG, W. et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. **PLoS One**.;7(12), 2012.

UMD TP53 MUTATION DATABASE. Disponível em > <http://www.umd.be:2072> < (Acesso em Setembro de 2016)

USCS GENOME BROWSER DATABASE. Disponível em > <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html> < (Acesso em Setembro de 2016)

VÉGRAN, F. et al. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. **Oncogene**. 26(2):290-7, 2007

VÉGRAN, F. et al. Only missense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma. **PLoS One**. 8(1), 2013

VOGELSTEIN, B; LANE, D; LEVINE, AJ. Surfing the p53 network. **Nature**.408(6810):307-10, 2000.

WEINBERG RA. **A Biologia do Câncer**. Artmed, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme 2010 Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Setembro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).Cancer Control: knowledge into action. Palliative Care, 2007 Disponível em <<http://www.who.int/cancer/media/FINAL-Palliative%20Care%20Module.pdf>>

Acessado em Setembro de 2016

WU, N. et al. MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways. **British Journal of Cancer**. 109, 2853–2863, 2013

YAN, W; CHEN, X. Characterization of functional domains necessary for mutant p53 gain of function. **J Biol Chem**. 7;285(19):14229-38, 2010.

ZAMBETTI, GP. The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. **J Cell Physiol**. 213(2):370-3, 2007

ZHANG, Y. et al. Regulation of miR-200c by nuclear receptors PPAR α , LRH-1 and SHP. **Biochem Biophys Res Commun.** 416(1-2):135-9, 2011

ZHOU, JX. et al. Nonequilibrium Population Dynamics of Phenotype Conversion of Cancer Cells. **PLoS ONE** 9(12): e110714, 2014.

ZHOU, E. et al. Systematic analysis of the p53-related microRNAs in breast cancer revealing their essential roles in the cell cycle. **Oncol Lett.** 10(6): 3488–3494, 2015

APÊNDICES

APÊNDICE 1: INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H *TP53*

APÊNDICE 2: INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H *TP53*

APÊNDICE 3: ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR ARRAY-CGH, NAS CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H *TP53*

APÊNDICE 4: ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR ARRAY-CGH, NAS NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H *TP53*

APÊNDICE 1 - INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53

Paciente	Idade	Tipo de Tumor	Grau	Estágio	Tamanho do Tumor (mm)	Tamanho do Tumor (TNM)	Metástase	RE	RP	HER2	Ki67	DD	OC	DO	M
1	65	CLI	II	II-A	17	T1	A	POS	POS	NEG	SI	20/08/2001	UC-SED -t.p	06/2015	166
2	55	CDI	III	SI	32	T2	P	SI	SI	SI	SI	17/09/2001	SI	SI	SI
3	29	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	24/05/1999	SI	SI	SI
4	43	CDI	II	SI	25	T2	A	NEG	NEG	POS	SI	22/11/2004	SI	SI	SI
5	25	CDI	III	SI	45	T2	P	POS	SI	SI	SI	22/06/1999	SI	SI	SI
6	38	CDI	II	SI	26	T2	SI	SI	SI	SI	SI	08/05/2014	SED	SI	23
7	31	CDIS e CDI	II	II-B	25	T2	P	POS	NEG	NEG	40%	08/06/2010	UC-SED	03/2011	9
8	54	CI	III	II-B	12	T1	A	NEG	NEG	SI	40-50%	08/02/2011	SED	SI	64
9	64	CDI	I	I	13	T1	SI	SI	SI	SI	SI	02/03/2005	SI	SI	SI
10	46	CDI	II	II-A	22	T2	A	POS	POS	NEG	20-30%	28/09/2015	SI	SI	9
11	62	CDI	II	I	15	T1	SI	NEG	POS	POS	SI	18/12/2007	O-r.l	01/2008	8

POS: positivo, NEG: negativo, SI: sem informação, CDI: carcinoma ductal invasor, CDIS: carcinoma ductal in situ, CI: carcinoma intraductal, DD: data do diagnóstico, OC: ocorrência, DOC: data da ocorrência, M: meses; O: óbito, UC: última consulta; SED: sem evidência de doença; t.p = tumor de pâncreas; r.l= recidiva local

APÊNDICE 2 - INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53

Paciente	Idade	Grau	Estágio	Tamanho do Tumor (mm)	Tamanho do Tumor (TNM)	Metástase	RE	RP	HER2	Ki67	DD	OC	DO	M
1	52	III	III-B	90	T3	P	NEG	POS	POS	SI	09/12/2007	O-m.d	SI	SI
2	60	I	II-B	13	T1	P	POS	POS	NEG	SI	20/12/2007	SED	06/2016	102
3	61	II	III-B	40	T2	P	POS	POS	POS	SI	21/12/2007	O-m.o	02/2012	50
4	62	II	SI	50	T2	A	NEG	NEG	POS	SI	30/01/2008	UC	02/2008	NC
5	75	I	II-A	18	T1	A	POS	POS	NEG	SI	07/05/2008	SED	06/2016	97
6	54	III	SI	12	T1	P	POS	POS	POS	SI	19/07/2008	SED	06/2016	95
7	44	II	II-B	50	T2	A	POS	POS	NEG	SI	27/05/2009	O-m.FSCD	02/2012	33
8	72	II	SI	24	T2	A	POS	POS	NEG	5%	23/11/2009	SI	SI	SI
9	45	I	SI	5	T1	A	POS	POS	POS	5%	20/04/2010	SI	SI	SI
10	33	I	I	6	T1	A	POS	POS	NEG	10%	05/05/2010	SED	06/2016	73
11	86	III	II-A	30	T2	A	POS	POS	NEG	20%	01/06/2010	SED	06/2016	72
12	49	II	II-A	40	T2	A	POS	POS	NEG	SI	09/06/2010	SED	06/2016	72
13	51	II	III-A	21	T2	P	NEG	POS	NEG	SI	29/06/2010	SED	06/2016	72
14	71	I	I	10	T1	A	POS	POS	NEG	20-30%	06/07/2010	SED	06/2016	71
15	64	III	III-B	13	T1	P	POS	POS	POS	15-20%	18/07/2010	O-m.FSCD	09/2010	02
16	45	II	II-B	22	T2	P	POS	POS	POS	10%	28/07/2010	UC-SED	02/2015	55
17	74	III	II-A	35	T2	A	NEG	POS	NEG	40%	15/10/2010	UC-SED	12/2012	26
18	73	II	II-A	32	T2	P	POS	POS	NEG	5-10%	09/11/2010	SED	06/2016	67
19	46	III	II-B	40	T2	P	POS	POS	NEG	50%	12/12/2010	SED	06/2016	66
20	39	II	II-B	18	T1	P	POS	POS	NEG	5-10%	06/02/2011	UC-SED	08/2013	30
21	73	I	I	8	T1	A	POS	POS	NEG	10%	19/04/2011	SED	06/2016	62
22	81	II	II-A	40	T2	A	POS	POS	NEG	10%	25/07/2011	UC-SED	09/2011	2
23	58	II	II-A	17	T1	P	POS	POS	NEG	20%	25/07/2011	SED	06/2016	59
24	42	II	II-A	30	T2	A	POS	POS	NEG	20%	01/08/2011	SED	06/2016	58
25	34	III	SI	45	T2	P	NEG	NEG	NEG	65%	24/10/2011	SED	06/2016	56
26	89	III	II-B	35	T2	P	POS	POS	NEG	SI	08/07/2007	UC-SED	08/2007	NC
27	45	III	SI	57	T3	P	NEG	NEG	POS	SI	14/08/2007	O	SI	SI
28	56	II	II-B	40	T2	P	POS	POS	POS	SI	20/12/2005	SED	06/2016	126
29	39	II	II-B	45	T2	P	POS	NEG	NEG	SI	21/02/2006	SED	06/2016	124
30	40	II	II-B	35	T2	P	POS	POS	POS	SI	27/02/2005	VCD-r.l	06/2010	196
31	40	II	II-B	35	T2	P	POS	POS	POS	SI	05/12/2004	O-r.l	04/2008	40
32	56	II	II-B	30	T2	P	POS	POS	NEG	SI	16/11/2004	m.d - UC	07/2012	92
33	71	II	III-B	35	T2	P	POS	POS	POS	SI	06/06/2004	O-m.h	06/2006	30
34	68	I	II-A	14	T1	A	POS	POS	NEG	5%	28/01/2014	SED	06/2016	29
35	55	II	II-B	22	T2	P	POS	POS	NEG	5%	03/04/2014	SED	07/2016	26
36	50	II	III-A	35	T2	P	POS	POS	NEG	40%	12/08/2014	SED	06/2016	22
37	27	III	II-A	50	T2	A	NEG	NEG	NEG	SI	05/06/2005	SED	06/2016	132
38	54	II	II-B	32	T2	P	POS	POS	NEG	SI	21/08/2005	O-m.d	12/2006	16
39	67	II	I	15	T1	A	POS	POS	NEG	SI	18/11/2003	SED	06/2016	151
40	53	II	I	16	T1	A	NEG	NEG	POS	SI	28/04/2003	m.h-UC	06/2008	62
41	67	III	II-A	25	T2	A	POS	POS	NEG	SI	31/08/2003	r.l-UC	03/2008	55
42	46	II	II-B	28	T2	P	POS	POS	NEG	SI	29/03/2003	O- p.o	07/2007	51
43	63	III	II-B	40	T2	P	NEG	NEG	POS	SI	11/03/2003	O-c.ov	2010	84
44	73	III	III-A	60	T3	A	POS	POS	NEG	SI	23/02/2003	r.l-UC	06/2006	40
45	82	II	II-B	45	T2	P	POS	POS	NEG	SI	25/11/2002	r.l-UC	02/2012	111
46	80	III	II-A	25	T2	A	POS	POS	NEG	70%	29/09/2014	UC	10/2014	NC

47	72	I	I	14	T1	A	POS	POS	NEG	5-10%	23/09/2014	SED	06/2016	21
48	76	III	III-A	30	T2	P	POS	POS	NEG	30%	20/10/2014	SED	06/2016	20
49	68	III	II-A	25	T2	P	NEG	NEG	NEG	80%	08/12/2014	O-r.l	08/2014	9
50	45	I	I	13	T1	A	POS	POS	NEG	15%	12/01/2015	SED	06/2016	29

POS: positivo; NEG: negativo; SI: sem informação; DD: data do diagnóstico; OC: ocorrência; DOC: data da ocorrência; M: meses; O: óbito; UC: última consulta; SED: sem evidência de doença; VCD: viva com a doença; m.d: metástases disseminadas; m.o: metástase óssea; m.FSCD: metástase fossa supra clavicular direita; r.l: recidiva local; m.h: metástase hepática; p.o: pós operatório; c.ov: carcinoma de ovário

APÊNDICE 3 - ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR array-CGH, NAS CINCO PACIENTES COM A MUTAÇÃO R337H TP53

C	R	1	2	3	4	5
1	p13.3 - p12	-	-	-	Ganho	Ganho
	p35.1 - p32.3	-	Perda	-	-	-
	p36.33	-	-	-	-	Ganho
	q11.1 - q37.3	-	-	-	Ganho	-
	q21.1 - q44	-	-	Ganho	Ganho	Ganho
	q22-q.32.2	-	-	-	Ganho	-
	q32.2 - q44	-	-	-	-	Ganho
2	p25.3 - p12	Perda	-	-	-	-
	p25.3 - p25.1	-	Perda	-	-	-
	q11.1 - q37.3	-	-	-	Ganho	Ganho
3	p12.3	-	-	-	Ganho	Ganho
	p13 - p11.1	-	Perda	-	-	-
	p25.1 - p12.3	-	-	-	Perda	Perda
	p25.3	-	-	-	Perda	Perda
	p26.2 - p25.2	-	-	-	Ganho	-
	p26.3 - p25.1	-	-	-	-	Ganho
	p26.3 - p26.2	-	-	-	Ganho	-
	p26.3	-	-	-	-	Ganho
	q13.2 - q22.2	-	Perda	-	-	-
	q25.32 - q29	-	-	-	Ganho	Ganho
	q27.1 - q28	-	-	-	Ganho	-
q28 - q29	-	-	-	Ganho	Ganho	
4	p16.3 - p11	-	Perda	-	-	-
	q21.23 - q22.1	-	Ganho	-	-	-
	q22.2 - q28.1	-	-	-	Ganho	-
5	q27	-	-	-	Ganho	Ganho
	p15.33 - p14.3	-	-	-	Perda	Perda
	q33.3 - q35.3	-	-	-	-	Ganho
	p22.1	-	-	-	Ganho	Ganho
	p22.1 - p11.2	-	-	-	Perda	Perda

6	p22.2 - p22.1	Ganho	-	-	-	-
	p22.3	-	-	-	Perda e Ganho	Ganho
	p25.3 - p24.1	-	-	-	Perda	-
	p25.3 - p24.3	-	-	-	-	Perda
	q11.1 - q22.33	Perda	-	-	-	-
	q11.1 - q27	-	-	-	Perda	Perda
	q12 - q27	-	Perda	-	-	-
7	p14.2 - p13	-	-	-	Ganho	-
	p14.3	-	-	-	Ganho	Amplificação
	p14.3 - p13	-	-	-	-	Ganho
	p15.3 - p12.3	-	-	-	Ganho	-
	p15.3 - p14.3	-	-	-	Ganho	-
	p22.3 - p12.1	-	-	-	-	Ganho
	p22.3 - p15.3	-	-	-	Ganho	Ganho
	q21.11 - q32.1	-	Perda	-	-	-
	q21.3 - q36.3	-	-	-	Perda	-
	q32.1 - q34	-	Ganho	-	-	-
	q36.1 - q36.3	-	Perda	-	-	-
	p11.23 - p11.21	-	Ganho	-	-	-
	p11.23 - p11.22	Amplificação	-	-	-	-
	p12 - p11.21	-	-	Ganho	-	-
	p12 - p11.22	-	-	-	Ganho	Ganho
	8	p23.2	Amplificação	-	-	-
p23.2 - p11.23		Perda	Perda	-	-	-
p23.3 - p12		-	-	-	Perda	Perda
q11.1 - q12.1		-	-	-	Ganho	-
q11.1 - q24.3		Ganho	-	-	-	-
q11.21 - q12.1		-	-	-	-	Ganho
q11.21 - q24.3		-	Ganho	-	-	-

	q12.1 - q21.11	-	-	-	Ganho	Ganho	
	q12.1 - q24.3	-	-	Ganho	Ganho	Ganho	
	q21.13	-	-	-	-	Amplificação	
	q21.13 - q24.12	-	-	-	Ganho	-	
	q24.3	-	-	-	Ganho	-	
9	p24.3 - p13.2	-	Perda	-	-	-	
	p24.3 - p13.1	-	-	-	Perda	Perda	
	q21.13 - q34.3	-	-	-	Ganho	-	
	q21.33 - q31.1	-	-	-	Ganho	-	
	q21.32 - q34.3	-	-	-	-	Ganho	
	q31.3 - q32	-	-	-	Ganho	-	
	q33.3 - q34.11	-	-	-	Ganho	-	
	q34.2 - q34.3	-	-	-	Ganho	-	
	q34.13 - q34.3	-	-	-	-	Ganho	
		p12.1 - p11.22	-	-	-	Ganho	-
10	q11.21 - q11.23	-	-	-	Ganho	-	
	q11.21 - q21.3	-	-	-	-	Ganho	
	q11.23 - q21.1	-	-	-	-	Perda	
	q21.1 - q21.2	-	-	-	Ganho	-	
	q21.3 - q26.3	-	-	-	Perda	-	
	q22.1 - q26.3	-	-	-	-	Perda	
	q23.33 - q26.3	-	Perda	-	-	-	
	q26.13 - q26.3	-	-	-	Perda	-	
		p15.3 - p13	-	-	-	Perda	-
		p15.5 - p11.2	-	Perda	-	-	-
11	q13.5 - q14.1	Amplificação	-	-	-	-	
	q13.1 - q13.2	-	-	-	Ganho	Ganho	
	q13.4 - q25	-	-	-	Perda	Perda	

	q13.5 - q22.3	-	-	-	Perda	Perda
	q14.2 - q25	-	Perda	-	-	-
	q22.1 - q22.2	Amplificação	-	-	-	-
	q22.2 - q25	Perda	-	-	-	-
	q22.3 - q24.3	-	-	-	Perda	Perda
	q23.33 - q26.3	-	-	Perda	-	-
12	q14.1 - q24.31	-	Ganho	-	-	-
	q12 - q24.33	-	-	-	Ganho	Ganho
	q24.12	-	-	-	Amplificação	Amplificação
13	q11 - q31.2	-	Perda	-	-	-
	q11 - q34	-	-	-	Perda	-
	q12.11 - q34	-	-	-	-	Perda
14	q12 - q21.2	-	-	Ganho	-	-
	q13.3 - q21.1	-	-	-	Ganho	Ganho
	q21.1 - q32.33	-	Perda	-	Perda	Perda
	q24.3	-	Deleção	-	-	-
	q32.33	-	-	-	Ganho	-
15	q21.1 - q24.1	-	-	-	Ganho	-
	q26.1 - q26.3	-	-	-	Ganho	-
	p11.2	-	Ganho	-	-	-
16	p13.3	-	-	-	Ganho	-
	p13.3 - p11.2	-	-	-	Ganho	Ganho
	q11.2 - q24.2	-	-	-	-	Perda
	q11.2 - q24.3	Perda	-	-	-	-
	q12.1 - q24.2	-	Perda	-	Perda	-
17	p11.2	Ganho	-	-	-	-
	p13.3 - p11.2	Perda	Perda	-	Perda	Perda
	q11.2 - q25.3	Ganho	-	-	Ganho	Ganho
	q12 - q21.2	-	-	Amplificação	-	-
	q21.32 - q25.3	-	Ganho	-	-	-
	q21.33 -	-	-	Ganho	-	-

	q22					
	q22 - q23.2	-	-	Amplificação	-	-
	q25.3	-	-	Ganho	Ganho	-
18	p11.32 - p11.22	-	-	-	Perda	Perda
	q11.2 - q12.1	-	-	-	Ganho	Ganho
	q11.1 - q21.31	-	-	-	Ganho	-
	q11.2 - q21.33	-	-	-	-	Ganho
	q12.2	-	-	-	Perda	-
	q12.3 - q23	-	Perda	-	-	-
	p12	-	-	-	Perda	-
19	p13.11 - p12	-	-	-	Ganho	Ganho
	p13.2 - p13.12	Ganho	-	-	-	-
	p13.12 - p13.11	Ganho	-	-	Perda	Perda
	p13.2	Amplificação	-	-	Ganho e Perda	Ganho
	p13.3	Perda	-	-	Perda e Ganho	Ganho e Deleção
	p13.3 - p12	-	Perda	-	Ganho	-
	p13.3 - p13.12	-	-	-	Ganho	Ganho
	p13.3 - p13.12	-	-	-	-	Ganho
	q13.32 - q13.41	-	-	Perda	-	-
	q13.33	-	-	-	Ganho	Ganho
	q13.2 - q13.32	-	-	-	Perda	Perda
	q13.2 - q13.33	-	-	-	-	Perda
	q13.32 - q13.33	-	-	-	Perda	-
q13.33 - q13.42	-	-	-	Ganho	Ganho	
q13.33 - q13.43	-	-	-	Ganho	Ganho	
q13.42 - q13.43	-	-	-	Ganho	Ganho	
20	q11.21 - q11.23	-	-	Ganho	-	-
	q13.31 - q13.33	-	-	Ganho	-	-
	q11.21	-	-	-	Ganho	Ganho
	q13.13 -	-	-	-	Ganho	Ganho

	q13.33					
	q13.2	-	-	-	Ganho e Perda	Ganho e Perda
	q13.31 - q13.32	-	-	-	Ganho	Ganho
	q13.33	-	-	-	Perda	Perda
21	p11.2 - p11.1	-	-	-	Perda	-
	q21.1 - q22.3	Ganho	-	-	-	-
	q11.22	Amplificação	-	-	-	-
22	q11.22 - q13.32	-	Perda	-	-	-
	q11.1 - q12.1	-	-	-	Ganho	Ganho
	q13.31	-	-	-	Ganho	Amplificação
	p11.4 - p11.21	-	Perda	-	-	-
X	p22.33	-	-	-	-	Perda
	q22.1	-	-	-	-	Ganho
	q26.3 - q28	-	-	-	Ganho	Ganho

C: cromossomo; R: região

APÊNDICE 4- ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS OBSERVADAS, POR array-CGH, NAS NOVE PACIENTES SEM A MUTAÇÃO R337H TP53

C	R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	p36.13	-	-	Ganho	Ganho	-	Ganho	-	-	-	
	p36.32	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
	p36.33 - p13.2	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p36.33 - p36.31	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p36.33 - p36.32	-	-	Ganho	-	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	-	
	q21.3 - q44	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
2	q21.1 - q44	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	p11.2	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	
3	q37.3	-	-	Amplificação	-	-	Ganho	-	-	-	
	p21.31 - p21.1	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
	p26.1 - p24.3	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p24.3 - p21.1	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q25.2	Deleção	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q26.1	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	
4	q37.3	-	-	Amplificação	-	-	Ganho	-	-	-	
	p16.3 - p16.1	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p16.3	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
5	p16.1	-	Perda	-	Ganho	-	Ganho	-	Ganho	-	
	p15.33	-	Perda	-	Ganho	-	-	-	-	-	
6	p22.1	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
	p22.3	-	-	Amplificação	Ganho	Ganho	Ganho (2R)	Ganho	Ganho	-	
7	p22.3 - p11.2	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q11.23 - q36.3	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q22.1	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
8	q36.3	Perda	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
	p11.21	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	
	p11.22	Amplificação	Amplificação	-	Amplificação	-	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	
	p12 - p11.22	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	
	p12 - p11.21	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	p23.3	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
	p23.3 - p11.1	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	p23.3 - p12	Perda	-	Perda	-	-	-	-	-	-	
	p23.3 - p21.3	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
	p23.3 - p23.2	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	q11.1 - q24.3	Ganho	Ganho	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	q11.21 - q12.1	-	-	Perda	-	-	-	-	-	-	
	q11.21 - q12.3	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q12.1	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	q13.1 - q24.3	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	q21.3 - q23.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q24.11 - q24.12	Amplificação	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q24.3	-	-	-	-	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	-	
	9	p24.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
		p24.1 - p13.2	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
q34.3		-	-	Amplificação e Ganho	-	-	-	-	-	-	
10	q34.11	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
	q34.2 - q34.3	-	-	-	-	-	Ganho (2R)	Ganho	Ganho	-	
	p15.3 - p11.1	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	q11.21 - q26.3	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	q11.22	-	-	-	-	-	-	-	Ganho	-	
11	q26.3	-	-	Ganho	Ganho	-	Ganho	Ganho	Ganho	-	
	p11.2 - p11.12	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p15.5	-	-	Ganho	-	-	-	Ganho	Ganho	-	
	p15.5 - p11.12	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p15.5 - p15.4	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
	q11 - q13.2	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	q13.2 - q13.4	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	q13.3	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	
	q13.3 - q13.4	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q13.4 - q22.3	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	q13.4 - q25	-	-	Perda	-	-	-	-	-	-	
	q12 - q21.1	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q22 - q23.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	q23.2 - q24.33	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	q34	-	-	Ganho	-	-	Ganho	-	-	-	
14	q32.33	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho	-	
	q11.2 - q32.33	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
15	q11.2	-	-	-	Ganho	Ganho	-	-	-	-	
	q11.1 - q11.2	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
16	p13.3	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	p13.3 - p11.2	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p13.3 - p11.1	-	Ganho	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	q11.2 - q24.1	-	-	Perda	-	-	-	-	-	-	
	q11.2 - q24.3	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	q24.3	-	-	-	-	-	Ganho	-	Ganho	-	
	p11.2	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	
	p12 - p11.2	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-	
	p13.3	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-	
	p13.3 - p11.2	Perda	-	-	Perda	-	-	-	-	-	
p13.3 - p13.1	-	-	Perda	-	-	-	-	-	-		

	q11.1 - q11.2	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q11.2-q21.33	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q11.2 - q25.3	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q12 - q21.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q21.2 - q21.32	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22 - q24.2	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q23.2-q25.3	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q24.3	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q25.1 - q25.3	-	Perda	-	-	-	-	-	-	-
	q25.1	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q25.3	Perda	-	Amplificação	Ganho	-	Ganho	-	Ganho	-
18	q11.1 - q12.3	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q12.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q12.3 - q21.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q21.1 - q21.33	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q21.33 - q22.1	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22.3 - q23	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q23	Amplificação e Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
19	p13.11	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	p13 - p11.1	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-
20	q11.22	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q11.21 - q13.33	-	-	-	Ganho	-	-	-	-	-
	q13.12 - q13.33	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q13.2	-	-	Ganho	-	-	-	-	-	-
	q13.33	-	-	-	-	-	Ganho	-	Ganho	-
21	q11.2 - q21.1	Deleção	-	-	-	-	-	-	-	-
	q21.1 - q21.2	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q21.3 - q22.11	Ganho	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22.11	Ganho e Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22.13	Deleção	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22.2	Ganho e Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q22.3	Ganho (2R) e Perda	Perda	Ganho	-	-	Ganho (2R)	-	-	-
22	q11.2	-	-	-	-	Ganho	-	-	-	-
	q11.21 - q13.33	Perda	-	-	-	-	-	-	-	-
	q11.22	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação	Amplificação
	q13.1	Perda	Perda	-	Ganho	-	-	-	-	-
	q13.33	-	-	Amplificação	-	-	-	-	-	-
X	q11.21	-	-	-	Ganho	-	Ganho	Ganho	Ganho	-
	p22.33	-	-	-	-	Perda	-	Perda	Perda	Perda
	q28	-	-	-	-	-	Ganho	-	-	-

C: cromossomos; R: região; 2R: 2 regiões

