

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

DIANNE GALIOTTO

**FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE TP53 EM TUMORES
DE MAMA EM PACIENTES DE SANTA CATARINA**

Florianópolis
2011

DIANNE GALIOTTO

**FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE TP53 EM TUMORES
DE MAMA EM PACIENTES DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Iliada Rainha de Souza

Florianópolis
2011

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a Iliada Rainha de Souza por todos esses anos de confiança e por acreditar em mim, por compartilhar inúmeros valores que vão além do conhecimento acadêmico, pela disponibilidade, pelas experiências, lições de vida, compreensão, paciência, carinho, amizade, por sua ética e por seu apoio em todos os momentos

Às mulheres que participaram deste estudo sem as quais este trabalho não seria possível, o meu sincero agradecimento

A Prof^a. Dr^a Cláudia Vitória de Moura Gallo pela disponibilidade em me receber em seu laboratório, pela concessão de amostras analisadas e por aceitar o convite para compor a banca de avaliação desse trabalho

A Prof^a. Dr^a Maria Cecília Menks Ribeiro pelos ensinamentos, pelo empréstimo de equipamentos do laboratório e por gentilmente aceitar o convite para compor a banca de avaliação desse trabalho

A Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques, minha tutora e que com imenso carinho aceitou o convite para compor a banca de avaliação deste trabalho

Sinceros agradecimentos às Dr^{as}. Yara Costa Netto Muniz e Andrea Marrero pela ajuda inestimável, pelas correções e valiosas sugestões na finalização do presente trabalho

A Msc. Débora Denardin Lückemeyer, menina do sequenciamento, pela paciência e por gentilmente ceder alguns horários para o ensinamento sobre esta metodologia aqui empregada, colaborando para a realização desta dissertação

A minha mãe, Elsa e minha irmã, Bianca, por todo carinho e apoio nas horas mais difíceis, por terem sempre uma palavra certa na hora certa e por me incentivar sempre

Ao meu noivo, Diego, pelo carinho, pelo apoio incondicional e incentivo diário, por compreender a necessidade de minha ausência nesses anos para elaboração deste trabalho

A todos os companheiros e amigos do laboratório Cíntia, Leili, Ticiane, Mariáh, Bibiana, Amanda, Gabriela, Maria Luiza, Sandra, Emily, Bruna e Patrícia, pela convivência ao longo desses anos, pelos aprendizados, pelas conversas descontraídas, pelas risadas

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, com quem aprendi muito nesses anos de realização do curso de mestrado

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho

À DEUS, pela beleza da vida e por colocar todos vocês em meu caminho

Aos órgãos financiadores, CAPES, FAPESC e CNPq, que possibilitaram a realização desse trabalho

MUITO OBRIGADA

RESUMO

O gene *TP53* é um importante gene supressor tumoral que codifica uma proteína, p53, envolvida na regulação do ciclo celular e que desempenha um papel fundamental na resposta celular a estresses genotóxicos e não-genotóxicos, e que tem sido ligado ao desenvolvimento do câncer. Mutações somáticas neste gene são encontradas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos. No câncer de mama, a frequência de mutações no *TP53* é em torno de 20 a 35% sendo a alteração mais comum nesta patologia. Estas mutações podem alterar a conformação da proteína, prejudicando sua função transativadora de genes alvo. O presente estudo teve por objetivo analisar a presença de mutações nos éxons 5 a 8 do gene *TP53*, em células sanguíneas de pacientes (n=63) e indivíduos controles (n=67), e tumores de mama destas pacientes, todas mulheres residentes no Estado de Santa Catarina, e analisar a associação da presença dessas mutações com dados epidemiológicos (idade, ancestralidade informada, história familiar de câncer de mama, paridade, amamentação, menarca, menopausa, consumo de tabaco e álcool) e características clínico-patológicas do tumor. Após uma triagem das amostras pela técnica de PCR-SSCP, aquelas identificadas como mutadas foram sequenciadas. A associação de determinados genótipos e dados clínicos e epidemiológicos com a suscetibilidade ao câncer de mama foram identificadas através do teste *odds ratio* (OR), adotando-se Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o limite de significância. Mutações no gene *TP53* foram detectadas em 17% dos casos de câncer de mama analisados pela técnica de PCR-SSCP, sendo 70% confirmadas por seqüenciamento sendo em sua maior parte mutações do tipo *missense*. O presente estudo indicou, estatisticamente, uma associação positiva entre o consumo de álcool e a presença de mutações no gene *TP53* no câncer de mama (OR=2,842; $p=0,010$). Foi observada uma associação positiva entre o grau histológico e mutação em *TP53*, sendo que as mutações encontradas estavam associadas a um estágio mais agressivo de câncer, representado pelo grau III de Elston&Ellis (OR=0,024; $p=0,002$). Análises subseqüentes com um número amostral maior podem auxiliar na confirmação dos achados do presente estudo.

Palavras-chave: câncer de mama, mutações em *TP53*

Apoio: UFSC; FAPESC/SES; CNPq; CAPES.

ABSTRACT

The *TP53* gene is an important tumor suppressor gene that encodes a protein, p53, involved in the cell cycle regulation, and that plays an essential role in cellular response to genotoxic and non-genotoxic stress and has been associated to cancer development. Somatic mutations in this gene are found in, approximately, 50% of the human cancers. In breast cancer, the frequency of *TP53* mutations is about 20 to 35%, being the most common abnormality in this disease. These mutations may change the protein conformation, impairing the transcription of target genes. This study aimed to examine the presence of mutations in exons 5 to 8 of the *TP53* gene in blood cells of patients (n=63) and controls (n=67) as well as breast tumor cells from these patients, women living in the State of Santa Catarina (Brazil), and to analyze the association between these mutations with epidemiological data (age, informed ancestry, family history of breast cancer, parity, breastfeeding, menarche, menopause, smoking and alcohol intake) and clinical-pathological characteristics of tumor. After screening of the samples by PCR-SSCP, those identified as mutant were sequenced. The association of certain genotypes and clinical and epidemiological data with susceptibility to breast cancer were identified through the odds ratio test (OR), adopting confidence interval (CI) of 95% and considering $p=0.05$ as the significance threshold. Mutations in *TP53* were detected in 17% of the cases of breast cancer analyzed by PCR-SSCP, 70% were confirmed by sequencing being mostly of missense mutations. This study indicate a statistically positive association between alcohol consumption and the presence of mutations in the *TP53* gene in breast cancer (OR=2.842; $p=0.010$). It was observed a positive association with histological grade and mutations in *TP53*, these mutation were associated with an aggressive stage of cancer, represented by Elston's Grade III (OR=0.024; $p=0.002$). Further analyses including a larger group of study can help to confirm this finding.

Keywords: breast cancer, mutation *TP53*

Support: UFSC; FAPESC/SES; CNPq; CAPES

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira. 17
- FIGURA 2:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, de neoplasia maligna da mama feminina, estimadas para o ano de 2010, segundo a unidade da federação..... 17
- FIGURA 3:** localização do gene *TP53*, em humanos, no cromossomo 17..... 27
- FIGURA 4:** Representação esquemática do gene humano *TP53*..... 27
- FIGURA 5:** Estruturas das proteínas da família p53. o domínio de ligação ao DNA apresenta maior identidade entre elas. o domínio SAM (*sterile alpha motif*) que confere estabilidade a proteína, é apenas encontrado na p63 e p73 sugerindo que estas dividem um ancestral comum mais recente comparadas a p53. 28
- FIGURA 6:** Comparação da estrutura das proteínas da família p53 em humanos com outras espécies. o domínio de organização das proteínas humanas p53, p63 e p73 comparadas com as proteínas p63/p73 ancestrais de *drosophila melanogaster* (*dmp53*) e *caenorhabditis elegans* (*cep-1*). a porcentagem de identidade dos aminoácidos é dada tanto para o domínio de ligação ao dna quanto para o domínio de oligomerização. 29
- FIGURA 7:** Representação esquemática da estrutura da proteína p53. a p53 contém 393 aminoácidos, consistindo em três domínios funcionais: um domínio n-terminal de ativação, o domínio de ligação DNA e domínio de tetramerização c-terminal. o domínio n-terminal inclui o domínio de transativação e uma região rica em prolina. o domínio central de ligação do DNA é necessário para ligação ao DNA de modo sequência-específica. a região c-terminal é responsável por realizar uma função regulatória. resíduos neste domínio c-terminal podem sofrer modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação e acetilação. números indicam o número de resíduos nos domínios e região. NLS, sinal de localização nuclear; NES, sequência de sinal de exportação nuclear. 31
- FIGURA 8:** Estrutura a região n-terminal da p53. interação entre a p53 (em azul) e a proteína rpa70n..... 33
- FIGURA 9:** À esquerda representação da estrutura do domínio central da molécula p53, onde esta se liga ao DNA. à direita, representação da interação dois dímeros de p53, formando um homotetrâmero, com uma molécula de DNA..... 33

FIGURA 10: Representação esquemática dos domínios da proteína p53. o domínio central de ligação ao DNA (p53c) é o que se apresenta mais frequentemente mutado nos cânceres humanos. as barras acima do diagrama indicam os códons e sua frequência relativa de mutações de acordo com a agência internacional de pesquisa em câncer (IARC). ... **34**

FIGURA 11: Representação da estrutura do domínio de oligomerização da proteína p53. a p53 se apresenta na forma tetramérica, composta por dois homodímeros..... **36**

FIGURA 12: Representação da estrutura do domínio regulatório c-terminal da proteína p53 (em vermelho) ligada com a proteína s100b (em cinza) e íons de cálcio (Ca^{++})..... **36**

FIGURA 13: Esquema representativo da regulação da proteína p53. em condições normais, a p53 é marcada pela Mdm2, ou seja, a Mdm2 liga-se à p53 e, atuando como uma ubiquitina e3-ligase, promove sua autopolibiquitinação e também a da p53, o que direciona a p53 para o citoplasma e sua degradação no proteassomo. após um estresse genotóxico ou não, a p53 é fosforilada (ATM, ATR, Chk1 e Chk2), causando sua liberação da mdm2, com conseqüente inibição do sinal de exportação nuclear, resultando na estabilidade e ativação da p53. **37**

FIGURA 14: Vias de ação da proteína p53. em resposta a sinais de estresse, a p53 é ativada dentre outras vias pelas proteínas quinases. em conjunto com acetiltransferases coativadoras (p300/cbp) e componentes da maquinaria de transcrição (TFIID/H), p53 regula a transcrição de uma variedade de genes alvo, que determinam o tipo de resposta celular..... **38**

FIGURA 15: Proporção dos diferentes tipos de mutações somáticas de gene *TP53* encontradas nos cânceres humanos. 86% das mutações estão situadas no domínio de ligação ao dna (correspondente aos códons 125-300), sendo que destas a maior parte são mutações *missense* (88%) (abaixo). padrão de mutação em câncer de mama (acima). **41**

FIGURA 16: Distribuição das mutações somáticas por substituição de base simples do gene *TP53*. as barras pretas indicam os códons *hotspots*. **42**

FIGURA 17: Mecanismos propostos para o papel das mutações da proteína p53 na tumorigênese. dominante negativo: alguns mutantes p53 (amarelo) oligomerizam com p53 tipo-selvagem (wt) (verde) e inibem a ativação transcricional de maneira negativa-transdominante. ganho de função: alguns mutantes p53 (roxo) possuem novas funções não compartilhadas pelo tipo selvagem. esses mutantes, não ativam genes alvo de p53 normalmente, mas sim um grupo diferente de genes, como *mdr1* e *c-myc*..... **46**

FIGURA 18: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com: (a) tipo histológico; (b) grau de anaplasia do tumor; (c) tamanho tumoral (cm); (d) comprometimento linfonodal..... **73**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sobrevida média e número de linfonodos comprometidos nos casos de pacientes com câncer de mama.	25
TABELA 2: protocolo para as reações de pcr para os éxons 5 a 8 do gene <i>TP53</i>	60
TABELA 3: Iniciadores específicos aos éxons do gene <i>TP53</i> estudados utilizados para amplificação de cada uma das regiões de interesse durante a reação de pcr. incluído também o tamanho do fragmento amplificado e a referência bibliográfica.	60
TABELA 4: Programas utilizados para as reações de pcr para os éxons 5 a 8 do gene <i>TP53</i>	61
TABELA 5: Iniciadores específicos aos éxons do gene <i>TP53</i> estudados utilizados para a reação de sequenciamento de cada uma das regiões de interesse.	64
TABELA 6: Categorização, frequência e <i>odds ratio</i> (OR) das características epidemiológicas selecionadas para análise, seguidas dos valores de p e χ^2 . (grupo de pacientes n=59 e controle n=64).	68
TABELA 7: Presença da mutação nos éxons de 5 a 8 do gene <i>TP53</i> em pacientes com câncer de mama. identificação da amostra, éxon, localização da mutação, códon e aminoácido mutado e o efeito da alteração na função da proteína, baseados nos dados de sequenciamento.	69
TABELA 8: Categorização, frequência e <i>odds ratio</i> (OR) das características epidemiológicas selecionadas para análise, seguidas dos valores de p e χ^2 . (grupo de pacientes n=59 com e sem mutação).	71
TABELA 9: Distribuição das características clinico-patológicas e relação entre a presença e ausência de mutação em <i>TP53</i> em pacientes com câncer de mama.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
<i>ATM</i>	do inglês <i>ataxia-telangiectasia mutated gene</i>
<i>ATR</i>	do inglês <i>ataxia-telangiectasia and Rad3-related gene</i>
<i>BAG-1</i>	do inglês <i>Bcl-2-associated athano gene-1</i>
BAX	proteína pró-apoptótica membro da família bcl-2
<i>BRCA1</i>	do inglês <i>breast cancer 1 gene</i>
<i>BRCA2</i>	do inglês <i>breast cancer 2 gene</i>
C	citosina
°C	graus Celsius
Chk1	do inglês <i>cell cycle checkpoint kinase 1</i>
Chk2	do inglês <i>cell cycle checkpoint kinase 2</i>
<i>c-myc</i> myc	proto-oncogene que codifica a fosfoproteína nuclear c-
CpG	dinucleotídeos de citosina e guanina unidos por ligação
fosfodiéster	
<i>COMT</i>	do inglês “catechol-O-methyltransferase gene” ou
catecol orto-metil-tranferase	
<i>CYP</i>	do inglês <i>cytochrome P450 gene</i> ou citocromo P-450
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
G	guanina
GADD45 <i>protein</i>	do inglês <i>growth arrest and DNA damage-inducible</i>
<i>GST</i> S-transferase	do inglês <i>glutathione S-transferase gene</i> ou glutationa
HCl	ácido clorídrico
KV	kilovolts
KCl	cloreto de potássio
LOH	do inglês <i>loss of heterozygosity</i> ou perda de
heterozigosidade	
p14 ^{ARF}	proteína supressora de tumor p ^{14ARF}
p21 ^{waf1/Cip1}	proteína inibidora de ciclina
p53	fosfoproteína supressora de tumor
p63	proteína membro da família p53
p73	proteína membro da família p53
pb	pares de base
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomol

PUMA	do inglês <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
M	molar
mRNA	RNA mensageiro
Mdm2	do inglês <i>murine Double minute 2</i>
Mdm4	do inglês <i>murine Double minute 4</i>
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitros
mM	milimolar
<i>MnSOD</i>	do inglês <i>manganese superoxide dismutase gene</i>
NaCl	cloreto de sódio
<i>NAT1</i>	do inglês <i>N-acetyltransferase 1 gene</i> ou N-acetiltransferase 1
<i>NAT2</i>	do inglês <i>N-acetyltransferase 2 gene</i> ou N-acetiltransferase 2
ng	nanogramas
nm	nanômetro
NOXA	proteína pró-apoptótica membro da família bcl-2
OR	do inglês <i>odds ratio</i> ou razão de chances
<i>RAD</i>	do inglês <i>role of radiation gene</i>
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
<i>SOD1</i>	do inglês <i>superoxide dismutase 1 gene</i> ou superóxido
dismutase 1	
<i>SOD2</i>	do inglês <i>superoxide dismutase 2 gene</i> ou superóxido
dismutase 2	
T	timina
TATA box	promotor eucariótico
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TFIID	do inglês <i>transcription factor IID</i>
	TNM classificação para a maioria dos diferentes tipos de câncer: tamanho do tumor (T), envolvimento de nódulos linfáticos (N) e presença ou ausência de metástase (M)
<i>TP53</i>	do inglês <i>tumor suppressor gene TP53</i> ou gene da p53
<i>TP63</i>	do inglês <i>tumor suppressor gene TP63</i> ou gene da p63
<i>TP73</i>	do inglês <i>tumor suppressor gene TP73</i> ou gene da p73
Tris	trihidróxi-metil-amino-metano
U	unidade
UV	ultravioleta

V	volts
<i>XRCC</i> <i>gene</i>	do inglês <i>X-ray repair cross complementing protein</i>
<i>XPD</i>	do inglês <i>xeroderma pigmentosum group D gene</i>
μL	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	16
1.2 FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA	18
1.3 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE MAMA	23
1.3.1 Tipo Histológico	23
1.3.2 Comprometimento Linfonodal	24
1.3.3 Tamanho do Tumor	25
1.3.4 Grau Histológico	25
1.4 <i>TP53</i> E CÂNCER DE MAMA	26
1.4.1 O Gene <i>TP53</i> e sua Família gênica	26
1.4.2 A Proteína <i>p53</i>	31
1.4.3 Mutações no <i>TP53</i> em Câncer de Mama	40
1.4.4 Valor prognóstico das mutações do <i>TP53</i> no Câncer de Mama	47
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	55
4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	56
4.3 CONSERVAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	56
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	57
4.4.1 Extração e purificação de DNA genômico do sangue periférico	57
4.4.2 Extração e purificação de DNA genômico do tumor	58
4.4.3 Quantificação e verificação da qualidade do DNA extraído ... 58	
4.5 AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 5, 6, 7 E 8 DO GENE <i>TP53</i> E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%	59
4.6 POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES (SSCP) DOS ÉXONS 5 A 8 DO GENE <i>TP53</i>	62
4.6.1 Purificação do produto de PCR	63
4.6.2 Sequenciamento	64
4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	65
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5. RESULTADOS	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO GRUPO DE PACIENTES E CONTROLE	67

5.2 MUTAÇÕES NO GENE <i>TP53</i> E O CÂNCER DE MAMA	69
5.3 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	71
6. DISCUSSÃO	75
6.1 PROBLEMAS RELACIONADOS À PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SSCP	75
6.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO GRUPO DE PACIENTES.....	76
6.3 MUTAÇÕES NO GENE <i>TP53</i> E O CÂNCER DE MAMA	78
6.4 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	79
7. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXOS.....	101

1. INTRODUÇÃO

Células anormais, cuja regulação da multiplicação celular esteja comprometida, podem gerar descendentes que herdam a propensão para proliferar sem responder à regulação, resultando em uma proliferação celular clonal capaz de se expandir indefinidamente (CAVENEY & WHITE, 1996). Em tecidos sólidos esta expansão culmina com a formação de massas tumorais compactas que podem ser benignas ou malignas. Quando malignas, suas células adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes, ou seja, têm potencial para se disseminar e são denominadas de câncer.

O câncer é considerado uma doença de etiologia complexa por apresentar causa multifatorial, ou seja, é causado tanto por fatores externos (tabaco, agentes infecciosos, químicos ou físicos) quanto fatores internos (mutações herdadas, hormônios, fatores imunológicos e mutações decorrentes do metabolismo). Esses fatores causais podem agir juntos ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (AMERICAN CANCER SOCIETY-ACS, 2010). A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas e até centenas de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (DANTAS *et al.*, 2009).

Sendo o câncer uma doença genética, a identificação e caracterização dos genes envolvidos na sua origem e progressão são de fundamental importância para a compreensão das bases moleculares desta doença (PARMIGIANI & CAMARGO, 2004).

Os genes supressores de tumor, entre eles *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, inibem o crescimento celular, regulando negativamente a proliferação das células ou positivamente a apoptose (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a progressão do ciclo através da regulação dos *checkpoints* celulares, caso o DNA esteja danificado. Além desta classe de proteínas, ainda estão dentre os supressores de tumor as proteínas que promovem apoptose em resposta a lesões não reparadas no DNA e as enzimas envolvidas no processo de reparo do DNA. Uma vez que os supressores de tumor controlam negativamente a proliferação e a sobrevivência celular, mutações que podem alterar a função destes genes contribuem para o desenvolvimento do câncer (FERREIRA & ROCHA, 2004).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama origina-se da alteração (genética e/ou epigenética) de uma única célula da estrutura glandular mamária (POLYAK, 2007). Na maioria das vezes é derivado das células epiteliais que revestem a unidade do ducto terminal do lóbulo mamário e apresenta duas importantes fases na sua evolução: a fase *in situ*, na qual as células cancerosas não ultrapassam as camadas dos ductos, e a fase invasiva, quando ocorre a disseminação para os tecidos adjacentes (*apud* LEVY, 2010).

O câncer de mama é uma doença heterogênea de curso clínico variável e que atinge uma grande parcela da população mundial (NAGAI, 1995). Com um milhão de casos novos no mundo a cada ano, o câncer de mama compreende 23% de todas as neoplasias malignas que atingem as mulheres (PARKIN, 2005; McPHERSON *et al.*, 2000). Em relação a esse carcinoma o que chama a atenção, é sua elevada mortalidade, com aproximadamente 600.000 mortes por ano no sexo feminino (GAHAFOOR *et al.*, 2003).

As estatísticas indicam um aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 1960 e 1970 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (INCA) (BRASIL, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 apontam para a ocorrência de 49.240 casos novos de carcinoma de mama no país. Esse número corresponde à taxa bruta de incidência de 49:100.000 mulheres (FIGURA 1) (INCA) (BRASIL, 2009), sendo a neoplasia que mais causa morte entre as mulheres. Dos 466.730 novos casos de câncer diagnosticados em 2008, o câncer de mama foi o segundo mais incidente entre a população feminina, sendo responsável por 49.000 novos casos e 11.735 óbitos, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008).

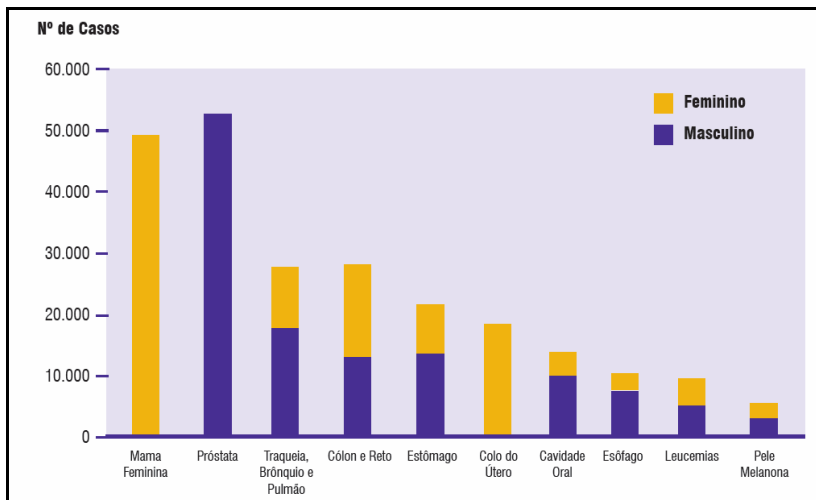


FIGURA 1: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pelo não melanoma, na população brasileira (INCA) (BRASIL, 2009).

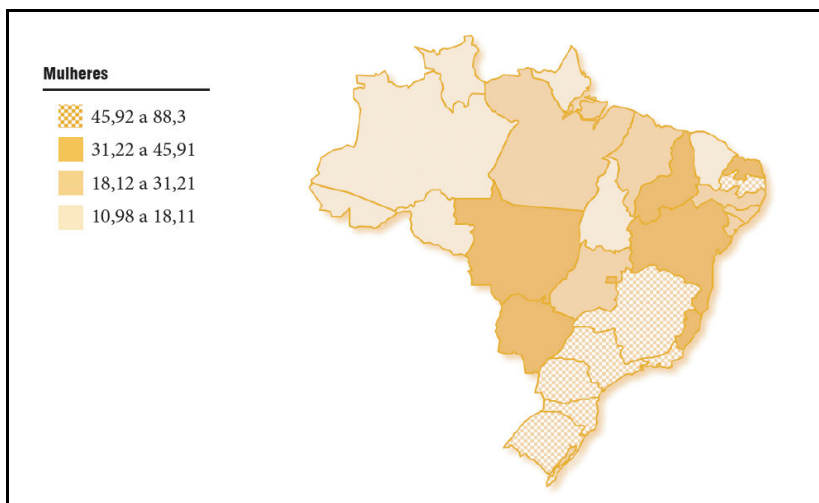


FIGURA 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, de neoplasia maligna da mama feminina, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (INCA) (BRASIL, 2009).

As estimativas para o ano de 2010, na região Sul, apontam o câncer de mama como o mais incidente entre as mulheres (64/100.000), sem considerar os tumores de pele não melanoma. No estado de Santa

Catarina esta estimativa é de 1.570 casos e particularmente, em Florianópolis, um número aproximado de 130 novos casos (INCA) (BRASIL, 2009).

Este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (65/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte é o segundo tumor mais incidente (17/100.000) (FIGURA 2) (INCA) (BRASIL, 2009).

A mortalidade por neoplasias no Brasil apresenta grande variação entre as unidades da Federação e cresceu consideravelmente ao longo das últimas décadas, retratando a transição epidemiológica e demográfica verificada em nosso país. Em geral, as taxas são maiores nos estados da Região Sul e menores na Região Norte, caracterizando um gradiente regional típico (INCA) (BRASIL, 2006).

A existência dessa variação regional na incidência e mortalidade de câncer de mama no Brasil pode estar relacionada a fatores ambientais e estilos de vida, como: padrão alimentar, obesidade, ingestão de ácidos graxos saturados, etilismo e exposição a agentes químicos. Sabe-se também que áreas mais desenvolvidas apresentam melhores procedimentos diagnósticos e melhor qualidade da informação sobre mortalidade em atestados de óbitos, o que pode influenciar o aumento da taxa de incidência e de mortalidade de câncer de mama nestas regiões (TORRESAN, 2006).

Nesse cenário, investimentos tecnológicos e em recursos humanos se tornam indispensáveis no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle de câncer, estimulando pesquisas que possibilitem uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes identificando, por exemplo, elementos que possam aumentar a compreensão acerca do comportamento biológico desta neoplasia e, por conseguinte, identificar pacientes com alto risco (INCA) (BRASIL, 2003 e 2009).

1.2 FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença multifatorial (MARTIN & WEBER, 2000) na qual vários fatores de risco, que podem ser classificados como genéticos e não-genéticos, interagem de forma complexa. A seguir, são destacados e discutidos alguns fatores que têm sido relacionados à etiologia do câncer de mama, sendo alguns já bem estabelecidos, outros ainda sob investigação (HULKA & MOORMAN, 2001).

✓ **IDADE:** A probabilidade de desenvolver câncer de mama aumenta com a idade, sendo que a cada década de vida o risco aumenta consideravelmente (ZIMMERMAN, 2004). Menos de 1% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com menos de 25 anos de idade. Entretanto, após os 30 anos há um nítido aumento da incidência de câncer de mama (BEREK & NOVAK, 2008). A partir dos 30 anos, o risco estimado de desenvolvimento de câncer de mama é de 1 em 250 mulheres; aos 40 anos é de 1 em 77 mulheres, enquanto que em idades mais avançadas, este risco aumenta exponencialmente, até a menopausa (por volta dos 50 anos), superando 1 em 34 mulheres (CÉBRIAN, 2005; BENZ, 2008). 80% dos casos da doença ocorrem em mulheres acima dos 50 anos de idade (BENZ, 2008). Uma mulher que não apresenta outro fator de risco tem apenas 2% de chance de desenvolver a doença antes dos 50 anos. Entretanto, se ela passar dos 85 anos o risco é de 12,5% (ZIMMERMAN, 2004).

✓ **FATORES HORMONAIS E REPRODUTIVOS:** O risco de câncer de mama aumenta com a duração da fase reprodutiva da mulher (BEREK & NOVAK, 2008). Menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade são fatores relacionados com o risco de desenvolver câncer de mama (MARTIN & WEBER, 2000). Esses fatores sugerem uma forte influência dos hormônios, especialmente os estrógenos, no desenvolvimento dessa neoplasia. Acredita-se que o mecanismo da carcinogênese seja o resultado da estimulação estrogênica do crescimento tecidual (proliferação) e do potencial genotóxico dos metabólitos resultantes do metabolismo do estrogênio sérico (PRUTHI *et al.*, 2007) como os estrogênios catecóis, que podem se ligar diretamente ao DNA e causar mutações (MITCHELL *et al.* 2006; LIEHR, 2000) ou gerar espécies de oxigênio reativas capazes de causar danos oxidativos ao DNA (LIEHR & ROY, 1990).

A menarca precoce, antes dos 12 anos, tem sido associada a um aumento do risco de câncer de mama na ordem de 10-20% (DUMITRESCU & COTARLA, 2005); o risco é reduzido de 5 a 20% para cada ano de atraso da menarca (ADAMI, 2008). Foi demonstrado que a menopausa tardia (≥ 54 anos) maximiza o risco de câncer de mama e que esse risco aumenta em aproximadamente 3% para cada ano acrescentado na idade da menopausa (DUMITRESCU & COTARLA, 2005; VERONESI *et al.*, 2005). Assim, a menopausa precoce parece proteger contra a doença, e a menopausa artificial por ooforectomia reduz ainda mais o risco do que a menopausa natural precoce (BEREK & NOVAK, 2008).

A amamentação também está relacionada ao câncer de mama. Mulheres que nunca engravidaram correm maiores riscos de desenvolver câncer do que as múltiparas (BEREK & NOVAK, 2008). Uma metanálise evidenciou que a cada gestação e a cada ano de amamentação, o risco relativo para câncer de mama diminui em 7% e 4,3%, respectivamente. A ação protetora da multiparidade é explicada pelo fato de que, no período de gravidez a glândula mamária atinge o seu ponto final de diferenciação, estando assim menos suscetível à ação de carcinógenos (DUMITRESCU & COTARLA, 2005). Além disso, o tempo de amamentação é importante, sendo a redução do risco proporcional ao aumento do tempo de amamentação (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2002). É importante ressaltar que há autores que não consideram que a lactação afete a incidência de câncer de mama, apenas a paridade (BEREK & NOVAK, 2008).

✓ **ÁLCOOL:** Embora ainda não tenha sido determinada uma relação definitiva entre o consumo de álcool e o aumento do risco de câncer de mama, estudos realizados têm demonstrado um aumento de risco de câncer de mama associada ao aumento da ingestão de álcool; a ingestão de 24 g de álcool por dia (equivalente a duas doses) pode aumentar o risco de câncer de mama em 21%, e este aumento é dose/tipo dependente. O mecanismo biológico pelo qual o álcool provavelmente aumenta o risco de câncer de mama é por elevar os níveis endógenos de estrogênio e androgênio (ACS, 2010). Além disso, o metabolismo do álcool aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, peróxidos, acetaldeído e outros agentes tóxicos que podem influenciar vários estágios do desenvolvimento do câncer de mama (MORCH *et al.*, 2007).

✓ **TABACO:** Os estudos sobre a relação entre o tabagismo e o câncer de mama são bastante controversos. Aparentemente, não é um fator importante na etiologia desta neoplasia (McPHERSON *et al.*, 2000). No entanto, dos mais de 50 agentes carcinogênicos encontrados na fumaça do cigarro, aproximadamente 20 substâncias estão listadas como carcinógenos mamários pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (BETTS, 2007). Esses carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), podem passar através da membrana alveolar e serem transportados ao tecido mamário por lipoproteínas do plasma. Devido sua afinidade por lipídios, os carcinógenos derivados do tabaco podem ser armazenados no tecido adiposo da mama e então bioativados pelas células epiteliais mamárias formando adutos com o DNA (CUI *et al.*, 2006). Estes compostos têm a

capacidade de se ligar covalentemente ao DNA, podendo levar ao surgimento de mutações em genes alvo (WEBER & NATHANSON, 2000). CONWAY *et al.* (2002) em um estudo com tumores de mama de mulheres fumantes e não-fumantes, evidenciou um aumento da prevalência e um espectro alterado de mutações no gene *TP53*, o que pode sugerir um envolvimento do tabaco com o câncer de mama.

✓ **ETNIA:** A incidência e a mortalidade por câncer de mama variam consideravelmente entre diferentes grupos étnicos (GHAFOR *et al.*, 2003). A incidência é maior entre euro-descendentes e afro-americanos, intermediária entre hispânicos e ameríndios, e mais baixa entre os asiáticos (ACS, 2010). No Brasil, a miscigenação da população deve influenciar o risco de câncer de mama (HALLAL *et al.*, 2001). A população brasileira é altamente heterogênea como consequência dos colonizadores europeus, escravos africanos e ameríndios, de modo que miscigenação entre esses componentes pode contribuir para a disparidade étnica no câncer de mama no país (NAGAI *et al.*, 2003).

✓ **HISTÓRIA FAMILIAL:** Cerca de 5 a 10% dos cânceres de mama têm natureza hereditária (PHAROAH *et al.*, 2007). Todos os genes herdados são autossômicos dominantes, mas têm penetrância variável (alta, média e baixa penetrância). Estudos de ligação gênica em famílias afetadas identificaram dois genes de alta penetrância: *BRCA1* e *BRCA2* (MIKI *et al.*, 2000; WOOSTER *et al.*, 1995). Ambos são considerados genes supressores de tumor e têm papel importante na reparação de danos do DNA e controle da proliferação celular (BOGLIOLO, 2006).

Embora mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* tenham sido identificadas como os principais genes de suscetibilidade em famílias com alto risco para câncer de mama, eles também aumentam o risco de câncer em ovário (PHAROAH *et al.*, 2007; LANGSENLEHNER *et al.*, 2003; KUSCHEL *et al.*, 2002; DUNNING *et al.*, 1999).

As portadoras dessas mutações da linhagem germinativa têm risco de 4% ao ano de desenvolver câncer de mama e de 35 a 85% ao longo de toda a vida. Além disso, o risco de desenvolver câncer na mama contralateral é de 65% (BEREK & NOVAK, 2008). Mutações germinativas em outro gene de suscetibilidade, o *TP53*, também estão associadas com um risco aumentado de câncer de mama. Estes cânceres geralmente acometem mulheres mais jovens e têm características tumorais desfavoráveis (KLIJN *et al.*, 2002).

Mutações germinativas nos genes *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHECK2* (genes supressores de tumor que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular e/ou com funções no reparo do DNA) e *HMMR* (interage

com o BRCA1 aumentando a instabilidade genética e interferindo no ciclo celular) também são de importância considerável para o carcinoma hereditário de mama (PUJANA *et al.*, 2007; FILHO, 2006).

Ainda, acredita-se que cerca de 30% de mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama devem apresentar um padrão genético de predisposição à doença (DUFLOTH *et al.*, 2005) e essa hipótese é reforçada se essas mulheres vierem a apresentar doença bilateral, associações com outras neoplasias, e um heredograma sugestivo de padrão autossômico dominante (LENOIR *et al.*, 1991).

A história familiar é especialmente importante se uma ou mais consanguíneas de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade (DUFLOTH *et al.*, 2005). Nesses casos, deve-se levar em conta se o câncer foi diagnosticado na pré-menopausa e se ocorreu em uma ou ambas as mamas, características que permitem avaliar o risco relativo em cada caso (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003). Mulheres com um ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama têm risco maior de desenvolverem a neoplasia (BERNESTEIN *et al.*, 1999; PHAROAH *et al.*, 1997), sendo que o risco aumenta à medida que aumenta o número de familiares afetados (COLDITZ *et al.*, 1993).

✓ **FATORES GENÉTICOS:** Nas últimas décadas, diversas evidências indicaram a natureza genética do câncer, isto é, o resultado do acúmulo de mutações herdadas e/ou adquiridas no genoma. Como já mencionado, os tumores hereditários de mama correspondem a 5-10% de todos os diagnósticos da doença e geralmente manifestam-se em idade precoce acometendo vários indivíduos em mais de uma geração da família. Porém, os demais 90-95% dos casos de câncer de mama são atribuídos a causas externas (isto é, fatores ambientais) que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética e a adquirida (MENKO *et al.*, 2007). Estes tumores malignos da mama algumas vezes decorrem de mutações esporádicas, ou seja, que não foram herdadas dos pais (TIEZZI, 2009; KALIKIN *et al.*, 1996). Outra parte deste percentual pode estar relacionada a variantes genéticas comuns de baixa a moderada penetrância, os polimorfismos genéticos (COSTA *et al.*, 2008). Dentre eles, podemos citar algumas famílias de genes como as dos *CYPs* e *GSTs* (metabolização de hormônios esteróides), *RADs*, *XRCCs*, *XPDs* (reparo de DNA lesado), *SOD1* e *SOD2* (ou MnSOD), *COMT*, *NAT1* e *NAT2* (vias de detoxificação), entre outros.

O gene *TP53* é um forte candidato a fator genético que pode causar variação de suscetibilidade ao câncer e dar indícios sobre a progressão da doença (BOND *et al.*, 2004). Mutações nesse gene são as

mais frequentes encontradas em 20 a 50% dos casos de carcinomas esporádicos (ZHOU *et al.*, 2009).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE MAMA

De acordo com o consenso de 2007 do Colégio Americano de Patologistas, os fatores prognósticos do carcinoma de mama são: tipo histológico, *status* dos linfonodos axilares, tamanho do tumor, grau histológico, resposta à terapia adjuvante, invasão linfática e vascular, *status* do receptor de hormônio, amplificação e/ou superexpressão do HER2 e idade da paciente (KYLE *et al.*, 2007). Dentre esses, destacam-se os quatro primeiros.

1.3.1 Tipo Histológico

Segundo o AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (2002), WHO (*World Health Organization*) (2003), TAVASSOLI & DEVILLE (2003) e BEREK & NOVAK (2008), os tumores malignos de mama são classificados da seguinte maneira: carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo, carcinoma mucinoso e carcinoma adenóide cístico.

Os carcinomas *in situ* são caracterizados pela proliferação de células neoplásicas dentro dos ductos ou dos lóbulos mamários e podem ser denominados:

✓ Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): é o tipo mais comum de carcinoma não-invasivo entre as mulheres e caracteriza-se por uma proliferação de células neoplásicas epiteliais restritas aos ductos mamários, não ultrapassando os limites da membrana basal, associada a um pleomorfismo nuclear, com alteração da orientação celular do revestimento epitelial. A disposição dessas células no interior dos ductos define os subtipos histológicos, sendo os principais: cribiforme, micropapilar, papilar sólido e comedocarcinoma. Na maioria das vezes tem prognóstico favorável.

✓ Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): caracteriza-se pela proliferação de células pequenas, não-coesas e uniformes no interior de ductos terminais e lóbulos.

Os carcinomas invasivos são caracterizados pela penetração de células neoplásicas no estroma mamário e podem ser denominados:

✓ Carcinoma ductal infiltrante: se inicia em um ducto da mama, encontra a parede do ducto e se espalha para o estroma. Caracteriza-se por apresentar células neoplásicas com diversos graus de atipia nuclear. Compreende 70% dos cânceres de mama e apresenta o pior prognóstico de todos os tipos ductais e cerca de 70% formam

metástases nos linfonodos axilares. O prognóstico tende a ser favorável em casos de carcinoma ductal isolado sem metástase.

✓ Carcinoma lobular infiltrante: microscopicamente, caracteriza-se por apresentar células pequenas e ovais que infiltram o estroma na forma característica, em “fila indiana”, com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. É relativamente incomum, representando apenas 5 a 10% dos casos de tumores de mama. O carcinoma lobular infiltrante tem uma propensão a envolvimento de linfonodos axilares e o prognóstico é similar ao carcinoma ductal infiltrante, com tendência à disseminação de metástases mais posteriormente.

✓ Carcinoma tubular: representa 1 a 2% de todas as neoplasias malignas da mama. Caracteriza-se pela presença de estruturas tubulares ou glandulares bem formadas infiltrando o estroma. Tende a apresentar melhor diagnóstico que o carcinoma ductal infiltrante e raramente apresenta metástases para linfonodos axilares.

Carcinoma mucinoso: também denominado de colóide, mais comum em pacientes mais idosas. Ao exame macroscópico, áreas do tumor podem apresentar-se mucinosas ou gelatinosas, enquanto microscopicamente são relativamente acelulares. Representa 3% dos carcinomas mamários. Apresenta baixa taxa de proliferação, mas pode alcançar proporções volumosas. Quando o tumor é predominantemente mucoso, o prognóstico tende a ser favorável.

Carcinoma adenóide cístico: são tumores de mama muito raros, histologicamente semelhantes aos observados nas glândulas salivares. Em geral, são cânceres bem diferenciados cuja metastatização é lenta.

1.3.2 Comprometimento Linfonodal

Este é o principal fator prognóstico para o câncer de mama. A presença de linfonodos axilares comprometidos indica: a) mau prognóstico, que piora em função do número de linfonodos acometidos; b) alto risco para a recidiva local, quando há comprometimento extracapsular dos linfonodos; c) e confirma o potencial de metastatização do tumor (adaptado GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003). Pacientes sem comprometimento metastático para linfonodos axilares apresentam um melhor prognóstico, tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença (ABREU & KOIFMAN, 2002), conforme indicado na TABELA 1. Havendo metástase linfonodal, o prognóstico piora quando ultrapassa 2mm de diâmetro, sendo então considerada macrometástase (FEBRASGO, 2001). Além disso, o *status*

axilar é o mais importante fator prognóstico, uma vez que define de forma segura a necessidade de terapia adjuvante (*apud* BERGMANN, 2000).

TABELA 1: Sobrevida média e número de linfonodos comprometidos nos casos de pacientes com câncer de mama. (Fonte: FEBRASGO, 2001).

Linfonodos comprometidos	Sobrevida (%) (5 anos)
0 a 3	62
4 a 9	35
> 9	10

1.3.3 Tamanho do Tumor

O tamanho do tumor juntamente com a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama, tanto que se constituem na base do estadiamento TNM (classificação TNM = Tumor, Nódulo e Metástase) da Classificação Internacional de Tumores da União Internacional Contra o Câncer/UICC (ABREU & KOIFMAN, 2002). O tamanho tumoral (T) é o fator prognóstico mais importante, quando a axila é negativa (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003) e encontra-se diretamente relacionado com o aumento da probabilidade de metástase regional, recorrência local e morte. À medida que o tumor progride, aumenta a possibilidade de metástase linfonodal e, na ausência desta, o diâmetro tumoral torna-se o mais importante fator prognóstico (FEBRASGO, 2001), de modo que tumores menores associam-se a prognósticos mais favoráveis. De acordo com RICCI & GIRIBELA (2004), o índice de sobrevida de 20 anos para tumores menores do que 1,0cm é de 88%, de 73% para os tumores entre 1,1 a 1,3cm, de 65% naqueles entre 1,4 a 1,6cm e de 59% para os tumores entre 1,7 a 2,2cm (*apud* RODRIGUES, 2009).

1.3.4 Grau Histológico

O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização (ABREU & KOIFMAN, 2002). O sistema de graduação histológica mais utilizado

é o de Bloom e Richardson, modificado por Elston & Ellis (1991) e denominado *Nottingham*. Esse sistema consiste na análise de três componentes morfológicos: formação tubular, pleomorfismo nuclear, e índice mitótico, cada um recebendo um valor de 1-3 (ELSTON & ELLIS, 1991). O grau histológico obtido é baseado no *score* final dessas três características que somadas geram um total que pode variar de 3-9 pontos (ELSTON & ELLIS, 1991); e que reflete a semelhança das células do tumor com o tecido original. Assim, os tumores são classificados em: a) 3-5 pontos: bem diferenciado (**grau I**); b) 6-7 pontos: moderadamente diferenciado (**grau II**) e c) 8-9 pontos: indiferenciado (**grau III**) (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003).

Com esta graduação, foi possível diminuir os problemas de reprodutibilidade e mostrar a forte associação entre graus histológicos e prognóstico (FARIAS *et al.*, 2005), sendo o grau histológico um forte indicador de sobrevida dos pacientes. Pacientes com carcinoma grau I tem sobrevida média de 85% em 10 anos comparados à pacientes com tumores grau III, com sobrevida menor que 45% no mesmo período (PONDER, 1995). Dessa forma, pacientes com tumores grau I tem sobrevida melhor que os graus II e III (ELSTON & ELLIS, 1991).

1.4 TP53 E CÂNCER DE MAMA

1.4.1 O Gene TP53 e sua Família gênica

TP53 foi o primeiro gene supressor de tumor identificado (GASCO *et al.*, 2002). Em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 17 (p13.1) (FIGURA 3). Contém 11 éxons (FIGURA 4), sendo o primeiro não codificante e codifica uma fosfoproteína nuclear tetramérica de 53 kilodaltons (KDa) (GUIMARAES & HAINAUT, 2002), com 393 aminoácidos, denominada proteína 53 (p53) (LATONEN & LAIHO, 2005) considerada a “guardiã do genoma” (EFEYAN & SERRANO, 2007).

O *TP53* faz parte de uma família de genes altamente conservados, a qual inclui dois outros membros, o *TP63* e o *TP73* que codificam respectivamente as proteínas p63 e p73 (LATONEN & LAIHO, 2005). Todos os membros têm um domínio de transativação amino-terminal (N-terminal), um domínio de oligomerização carbóxi-terminal (C-terminal) e um domínio central de ligação ao DNA (FIGURA 5). Enquanto aqueles parecem ser amplamente divergentes, o domínio de ligação ao DNA é significativamente conservado, com alta similaridade

de sequência (LEVINE & OREN, 2009; BOURDON *et al.*, 2007) entre os membros da família da proteína p53, o que permite aos p63 e p73, a transativação de genes-alvo da p53, podendo ocasionar a parada do ciclo celular ou apoptose (BOURDON *et al.*, 2007; SOUSSI, 2007; LATONEN & LAIHO, 2005) por meio da existência de uma complexa rede de interação entre o produto desses três genes (SOUSSI, 2007).

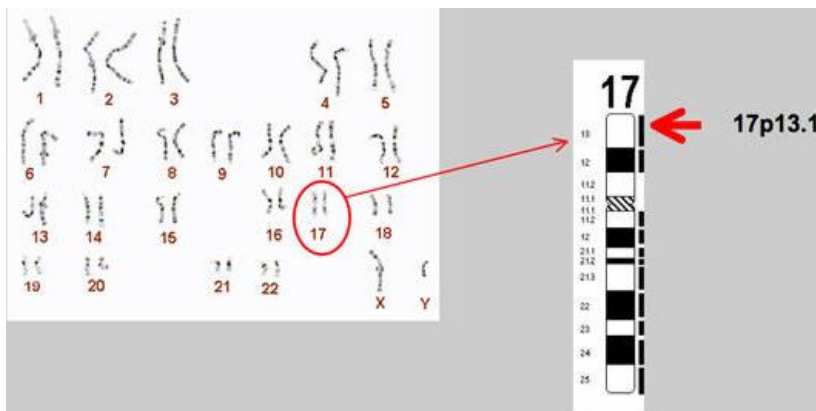


FIGURA 3: Localização do gene TP53, em humanos, no cromossomo 17. (Fonte: modificada do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html).

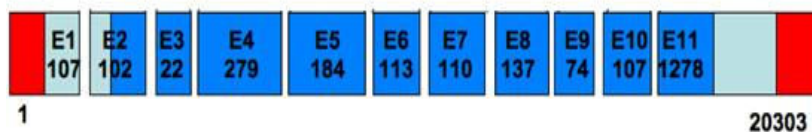


FIGURA 4: Representação esquemática do gene humano *TP53*. Possui 11 éxons (em azul). (Fonte: modificada do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html).

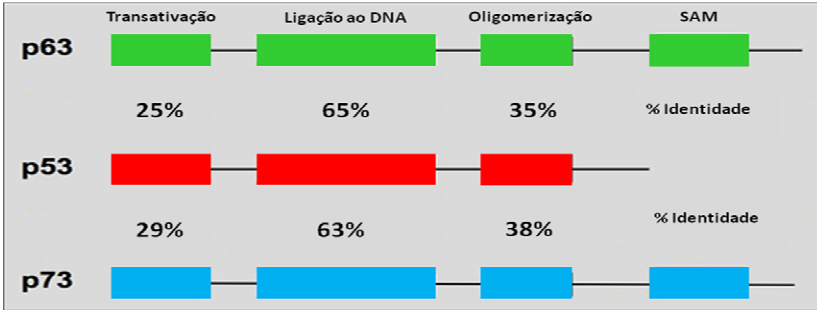


FIGURA 5: Estruturas das proteínas da família p53. O domínio de ligação ao DNA apresenta maior identidade entre elas. O domínio SAM (*sterile alpha motif*) que confere estabilidade a proteína, é apenas encontrado na p63 e p73 sugerindo que estas dividem um ancestral comum mais recente comparadas a p53 (Fonte: http://p53.free.fr/p53_info/p73_p63.html).

Além disso, os domínios de ligação ao DNA da família do gene *TP53* (*TP53/TP63/TP73*) em humanos, têm sido conservados ao longo do tempo evolutivo, apresentando homologia estrutural nas diferentes espécies como em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (FIGURA 6) (BELYI & LEVINE, 2009; BOURDON, 2007). A conservação desta sequência presumivelmente correlaciona-se com a necessidade de preservar uma estrutura particular ou uma função da proteína p53 (ROBBINS, 1996 *apud* ABREU, 2008), visto que tanto as proteínas de invertebrados como as de vertebrados reconhecem e se ligam às mesmas sequências de DNA que regulam genes semelhantes nas diversas espécies, levando à apoptose após um evento de dano ao DNA (BELYI & LEVINE, 2009).

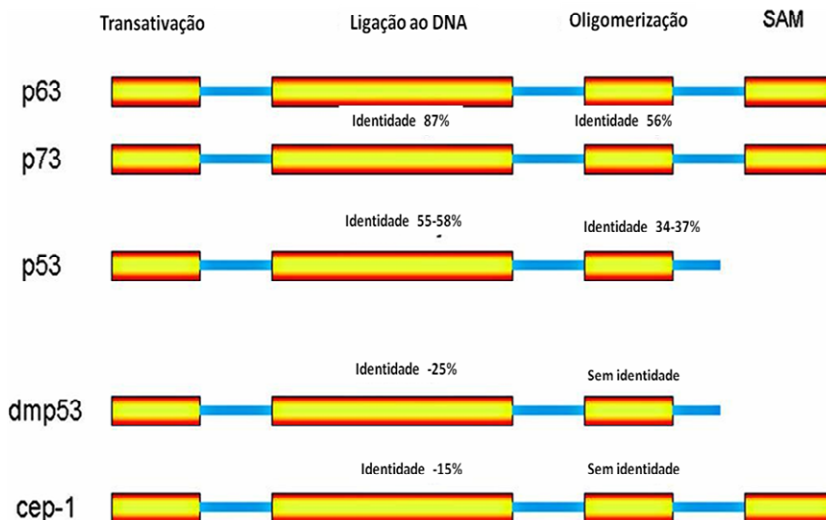


FIGURA 6: Comparação da estrutura das proteínas da família p53 em humanos com outras espécies. O domínio de organização das proteínas humanas p53, p63 e p73 comparadas com as proteínas p63/p73 ancestrais de *Drosophila melanogaster* (dmp53) e *Caenorhabditis elegans* (cep-1). A porcentagem de identidade dos aminoácidos é dada tanto para o domínio de ligação ao DNA quanto para o domínio de oligomerização. (Fonte: modificado de BELYI & LEVINE, 2009).

Apesar das proteínas p53, p63 e p73 serem estruturalmente e funcionalmente relacionadas, exercem funções biológicas específicas. Como muitos dos genes do genoma humano, os membros da família da p53 expressam múltiplas variantes de mRNA (isoformas) devido a *splicing* e promotores alternativos (BOURDON, 2007).

REISMAN *et al.* (1988) identificaram dois promotores do gene *TP53*, sendo que o primeiro (p53P1) estaria localizado na região de 100 a 250 pares de bases à jusante do primeiro éxon (não codificante) e o segundo (p53P2), um promotor mais eficiente, dentro do primeiro íntron. Recentemente, foi demonstrada a existência de um terceiro promotor (p53P3) interno localizado no meio do íntron 4 (BOURDON *et al.*, 2005). Segundo MARCEL & HAINAUT (2009) e BOURDON (2007), o gene *TP53* poderia codificar dez isoformas diferentes da proteína p53 devido ao *splicing* alternativo do íntron 9, o uso do promotor alternativo no íntron 4 e a iniciação alternativa de tradução ou *splicing* alternativo do íntron 2. *Splicing* alternativo também ocorre

entre os éxons 9 a 11. Em muitos cânceres, este gene está frequentemente inativado por deleção ou mutação; naqueles que conservam o tipo-selvagem do *TP53*, outros tipos de alterações têm sido descritas na via p53 resultando em uma diminuição da função da proteína (MARCEL & HAINAUT, 2009).

O gene *TP63* contém 15 éxons (OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005), está localizado na região cromossômica 3q27 (HANKER *et al.*, 2010) e em humanos expressa pelo menos seis isoformas alternativas por *splicing* da região C-terminal e que podem ser transcritas a partir de um promotor alternativo localizado no íntron 3 (HANKER *et al.*, 2010; OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005). Em tumores, como os carcinomas mamários, a isoforma N-truncada da p63 pode agir como um inibidor dominante negativo da atividade da p53; por outro lado a p53 mutante pode ativar as funções da p63 de sobrevivência da célula e inibir as de apoptose, ocasionando o desenvolvimento do tumor (HRSTKA *et al.*, 2009; MARCEL & HAINAUT, 2009). No entanto, o papel da p63 em neoplasia, especialmente no câncer de mama, não é claramente descrito. Mutações no *TP63* são raras. Seu potencial como um gene supressor de tumor tem sido discutido. Enquanto o *TP53* possui como principal função responder às agressões ao DNA, o *TP63* parece ser essencial ao desenvolvimento e diferenciação de determinados tecidos (RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

O outro membro da família, o gene *TP73*, contém 14 éxons (OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005) e está localizado no cromossomo 1p36, uma região em que a perda de heterozigose é frequentemente observada em vários tumores humanos (DeYOUNG & ELLISEN, 2007; RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003; CORN *et al.*, 1999). Expressa pelo menos seis isoformas derivadas do *splicing* alternativo da extremidade C-terminal do transcrito primário (OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005) e pelo menos quatro, por *splicing* da região N-terminal que podem ser transcritas a partir de um promotor alternativo localizado no íntron 3 (BOURDON *et al.*, 2005). Estes variantes da p73 apresentam diferentes propriedades transcricionais e biológicas (OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005). Assim como a p63, a isoforma N-truncada da p73 pode agir como um inibidor dominante negativo da atividade da p53 e em particular pode operar como um oncogene, por meio da neutralização da atividade supressora da p53 (MARCEL & HAINAUT, 2009; OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005), uma vez que ela pode bloquear o ciclo celular e desencadear a apoptose, por um mecanismo paralelo e independente da p53, via acetilação da p73 por meio da acetiltransferase p300

(RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003). Além disso, a p73 também pode interagir e parcialmente compensar a perda de atividade da p53 (OKAZAKI & NAKAGAWARA, 2005). Embora seja encontrada superexpressa em diferentes tipos de câncer, dentre eles os carcinomas mamários, assim como o *TP63*, mutações em *TP73* são raras em contraste com as mutações frequentes em *TP53* (TOPHKHANE *et al.*, 2009).

1.4.2 A Proteína p53

A proteína p53 possui 393 aminoácidos (LATONEN & LAIHO, 2005) e organiza-se em três domínios estruturais e funcionais (FIGURA 7) (BAI & ZHU, 2006; LACROIX *et al.*, 2006):

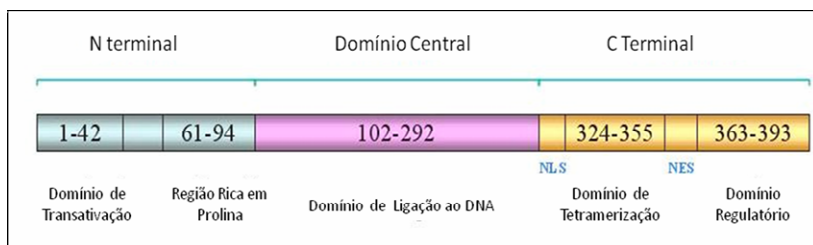


FIGURA 7: Representação esquemática da estrutura da proteína p53. A p53 contém 393 aminoácidos, consistindo em três domínios funcionais: um domínio N-terminal de ativação, o domínio de ligação DNA e domínio de tetramerização C-terminal. O domínio N-terminal inclui o domínio de transativação e uma região rica em prolina. O domínio central de ligação do DNA é necessário para ligação ao DNA de modo sequência-específica. A região C-terminal é responsável por realizar uma função regulatória. Resíduos neste domínio C-terminal podem sofrer modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação e acetilação. Números indicam o número de resíduos nos domínios e região. NLS, sinal de localização nuclear; NES, sequência de sinal de exportação nuclear. (Fonte: modificado de BAI & ZHU, 2006).

- 1) um domínio de transativação (resíduos 1-42) e uma região rica em prolina (resíduos de 61-94) na porção N-terminal ou amino-terminal;
- 2) um domínio central de ligação ao DNA sequência-específica (resíduos 102 -292) que corresponde a parte principal da proteína;
- 3) um domínio de oligomerização ou tetramerização (resíduos 324-355) e um domínio

regulatório (resíduos 363-393) na região C-terminal ou carbóxi-terminal.

O domínio de ativação transcricional é necessário para que a proteína p53 exerça sua atividade de transativação. Possui sítio de interação para a proteína de ligação ao TATA *box* e para o fator de transcrição basal TFIID, além de também interagir com as proteínas Mdm2/Mdm4, reguladoras negativas do gene *TP53*. O domínio rico em prolina contém sítios envolvidos em interações proteína-proteína nas vias de transdução de sinal, sendo uma região importante na ativação da apoptose dependente de p53. A estrutura da região N-terminal é naturalmente desenovelada, no entanto, quando ocorre a interação com outras proteínas no domínio de transativação, estes locais tornam-se totalmente enovelados (*alfa-hélice*) (FIGURA 8). Além disso, essa região sofre modificações pós-traducionais, como fosforilação que implicam na estabilidade da proteína e na especificidade dos alvos de transativação (OKOROKOV & ORLOVA, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; McKINNEY & PRIVES, 2007; BAI & ZHU, 2006).

O domínio central da proteína contém a região de ligação ao DNA, que ocorre de modo sequência-específica. É formado por um complexo composto de duas folhas *beta-pregueada* que permitem um molde básico para a superfície de ligação ao DNA, que por sua vez é subdividida em duas estruturas: (a) uma que se liga ao sulco maior do DNA e é formada por *alfa-hélice*, folha *beta-pregueada* e alça; (b) outra formada por duas grandes alças estabilizadas pelo íon zinco e que se liga ao sulco menor do DNA, através do resíduo de arginina (248). O íon zinco além de desempenhar papel importante na ligação da p53 ao DNA também é requerido para a manutenção da estrutura conformacional da p53 (FIGURA 9), de modo que a perda do íon zinco resulta em diminuição da estabilidade termodinâmica da p53, tendência à agregação e perda da especificidade de ligação ao DNA (OKOROKOV & ORLOVA, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; McKINNEY & PRIVES, 2007; BAI & ZHU, 2006; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

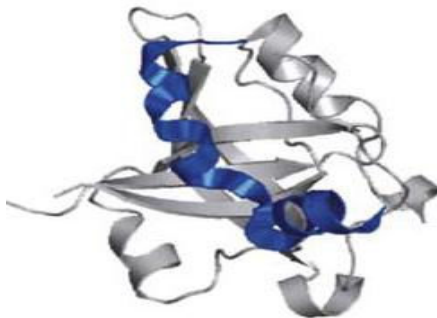


FIGURA 8: Estrutura a região N-terminal da p53. Interação entre a p53 (em azul) e a proteína RPA70N (em cinza). (Fonte: OKOROKOV & ORLOVA, 2009).

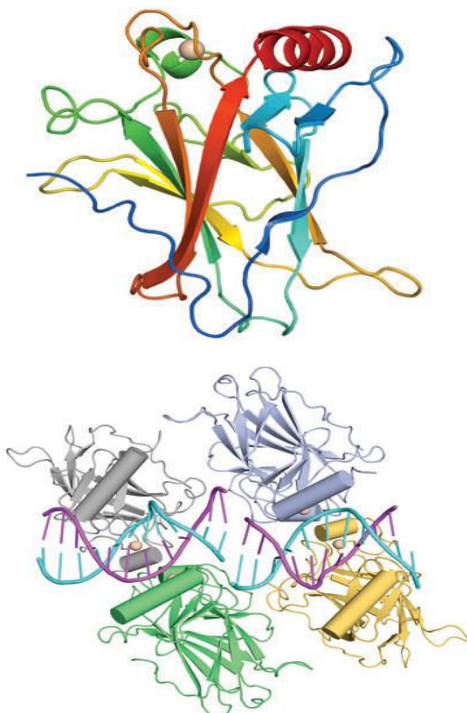


FIGURA 9: À esquerda representação da estrutura do domínio central da molécula p53, onde esta se liga ao DNA. À direita, representação da interação dois dímeros de p53, formando um homotetrâmero, com uma molécula de DNA. (Fonte: JOERGER & FERSHT, 2008).

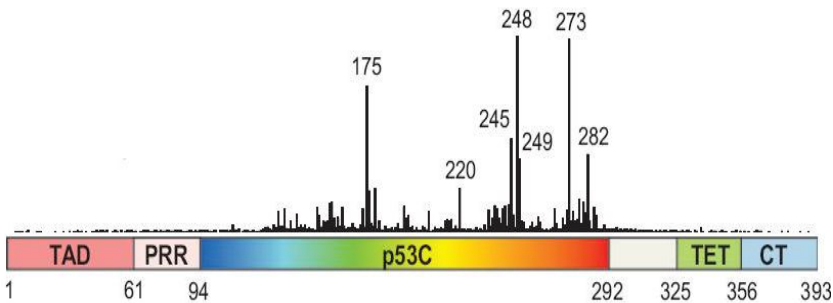


FIGURA 10: Representação esquemática dos domínios da proteína p53. O domínio central de ligação ao DNA (p53C) é o que se apresenta mais frequentemente mutado nos cânceres humanos. As barras acima do diagrama indicam os códons e sua frequência relativa de mutações de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). TAD: Domínio de transativação; PRR: Domínio rico em prolina; TET: Domínio de tetramerização; CT: Domínio C-terminal (Fonte: JOERGER & FERSHT, 2008).

É ainda, no domínio central onde, correspondentemente no gene, se encontra a maioria das mutações de *TP53* em células tumorais (FIGURA 10), o que evidencia a importância da molécula p53 como supressora de tumor. Alterações nessa região podem resultar na perda de contato ao DNA, como é o caso de mutações em regiões do gene correspondentes aos códons 248 e 273; e na alteração da estrutura de ligação da p53 ao DNA, devido a mutações em regiões do gene correspondentes aos códons 175, 245, 249 e 282, resultando na perda de atividade transcricional da p53 (OKOROKOV & ORLOVA, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; MCKINNEY & PRIVES, 2007; BAI & ZHU, 2006; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

O domínio de oligomerização é o responsável pela apresentação da p53 na forma de tetrâmeros, que ocorre com a formação de dímeros de dímeros (FIGURA 11). Consiste de uma folha *beta-pregueada* seguida por uma *alfa-hélice* ligada por uma pequena dobra em cada monômero. Dois monômeros formam um dímero que é estabilizado via folha *beta-pregueada* intermolecular antiparalela e *alfa-hélice* antiparalela. Estes monômeros são mantidos juntos por interações hidrofóbicas. Neste domínio também está localizado um sinal de exportação nuclear (NES). O domínio regulatório, na porção C-terminal, é altamente básico, e capaz de interagir com o DNA de uma maneira não sequência-específica, reconhecendo principalmente danos na molécula

de DNA. Sua conformação é desenovelada adquirindo uma estrutura secundária estável quando se liga inespecificamente com o DNA ou outras proteínas (FIGURA 12). Contém muitos sítios de ubiquitinação e de modificação como fosforilação e acetilação, induzidas por estresse, além de três sinais de localização nuclear (NLS). Sua ausência promove um aumento na ligação específica da p53 ao DNA, o que evidencia seu papel regulador negativo. Propõe-se que essa região seja responsável pela manutenção do estado “latente” da p53 (OKOROKOV & ORLOVA, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; SOUSSI, 2007; MCKINNEY & PRIVES, 2007).

A proteína p53 é expressa em muitos tipos celulares, estando na sua forma inativa ou latente, em concentrações muito baixas, sob condições normais (ROSSNER *et al.*, 2009; OKOROKOV *et al.*, 2006; SUTCLIFFE & BREHM, 2004), devido à ação realizada pela ubiquitina E3-ligase Mdm2/Hdm2 (FIGURA 13), por meio de dois mecanismos: promovendo a liberação da p53 para o citoplasma e sua consequente degradação pelo proteassomo, e bloqueando seu domínio de transativação (MARCEL & HAINAUT, 2009; BERTHEAU *et al.*, 2008; LUKASHCHUK & VOUSDEN, 2007; SUTCLIFFE & BREHM, 2004). O Mdm2, juntamente com seu homólogo o Mdm4, controla a atividade transcricional da p53, agindo como supressor da função desta, por meio de uma auto-regulação negativa. Recentemente, duas outras E3-ligasas para p53 foram identificadas: Pirh2 e Cop1, ambas promovendo ubiquitinação e degradação da p53 independentemente de Mdm2 (FARNEBO *et al.*, 2010; LEVINE & OREN, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; BERTHEAU *et al.*, 2008; LATONEN & LAIHO, 2005; SUTCLIFFE & BREHM, 2004).



FIGURA 11: Representação da estrutura do domínio de oligomerização da proteína p53. A p53 se apresenta na forma tetramérica, composta por dois homodímeros. (Fonte: OKOROKOV & ORLOVA, 2009).

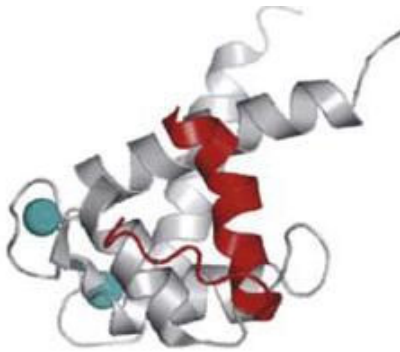


FIGURA 12: Representação da estrutura do domínio regulatório C-terminal da proteína p53 (em vermelho) ligada com a proteína S100B (em cinza) e íons de Cálcio (Ca⁺⁺). (Fonte: OKOROKOV & ORLOVA, 2009).

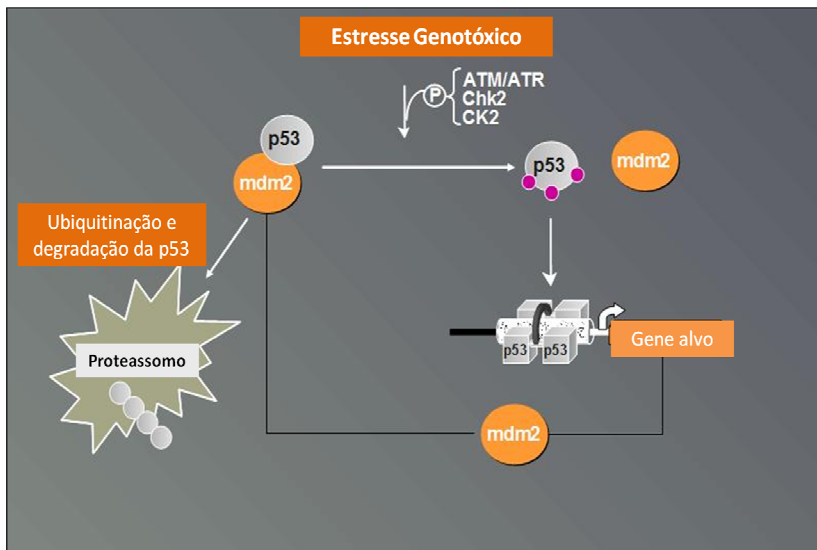


FIGURA 13: Esquema representativo da regulação da proteína p53. Em condições normais, a p53 é marcada pela Mdm2, ou seja, a Mdm2 liga-se à p53 e, atuando como uma ubiquitina E3-ligase, promove sua auto-poliubiquitinação e também a da p53, o que direciona a p53 para o citoplasma e sua degradação no proteassomo. Após um estresse genotóxico ou não, a p53 é fosforilada (ATM, ATR, Chk1 e Chk2), causando sua liberação da Mdm2, com conseqüente inibição do sinal de exportação nuclear, resultando na estabilidade e ativação da p53. (FONTE: modificado IARC, 2010).

Ativação de oncogene, danos ao DNA, hipóxia, e outros sinais de estresse

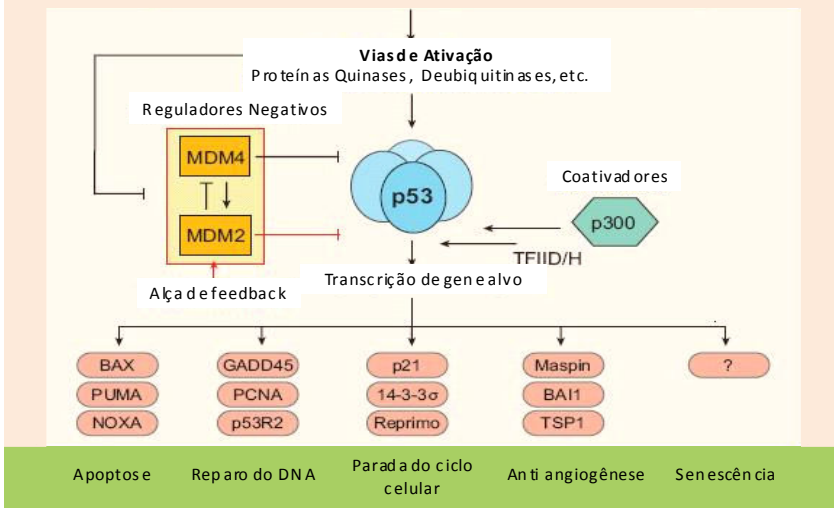


FIGURA 14: Vias de ação da proteína p53. Em resposta a sinais de estresse, a p53 é ativada dentre outras vias pelas proteínas quinases. Em conjunto com acetiltransferases coativadoras (p300/CBP) e componentes da maquinaria de transcrição (TFIIID/H), p53 regula a transcrição de uma variedade de genes alvo, que determinam o tipo de resposta celular. (FONTE: modificado JOERGER & FERSHT, 2008).

No entanto, quando as células são expostas a sinais de estresse, primariamente genotóxicos, a p53 se torna estável, através de modificações pós-traducionais que permitem seu escape da degradação, e se acumula na célula. Uma vez ativada, a p53 vai exercer vários efeitos antiproliferativos, determinados de acordo com a intensidade do dano, através da indução de genes alvo envolvidos com a regulação do ciclo celular, reparo do DNA, senescência, apoptose e angiogênese (FIGURA 14) (OLIVIER *et al.*, 2010; OROKOV & ORLOVA, 2009; ROSSNER *et al.*, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; SMEENK *et al.*, 2008; LATONEN & LAIHO, 2005; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

No caso de danos ao DNA (radiação UV, carcinógenos químicos, drogas citotóxicas) proteínas-quinases, pertencentes à família fosfatidilinositol 3-quinase, como ATM e ATR; e quinases regulatórias do ciclo celular, como Chk1 e Chk2, irão fosforilar a p53 (resíduos de

serina[Ser15]/tirosina[Thr18]), ativando-a, e impedindo a interação Mdm2/Mdm4-p53, de modo que a p53 se acumula na célula realizando a função de supressora tumoral (JUNTTILA & EVAN, 2009; MARCEL & HAINAUT, 2009; LACROIX *et al.*, 2006; LATONEN & LAIHO, 2005; SUTCLIFFE & BREHM, 2004; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

Quando oncogenes estão ativados estes podem induzir a expressão da proteína p14^{ARF} que inibe a Mdm2, impedindo dessa forma que haja ubiquitinação e degradação da p53 via Mdm2. Consequentemente, a p53 é estabilizada, e se acumula na célula. Uma vez acumulada e ativada, a p53 poderá regular a ativação ou repressão transcricional de vários genes envolvidos com a parada do ciclo celular na fase G1/S (p21^{waf1/Cip1}), G2 (14-3-3 σ) e G2/M (p21^{waf1/Cip1}, GADD45), apoptose (BAX, PUMA e NOXA) e reparo de DNA (GADD45) (FARNEBO *et al.*, 2010; LATONEN & LAIHO, 2005; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

Estudos recentes sugerem ainda um papel para p53 na determinação da resposta das células ao estresse de nutrientes (ativada pela AMP quinase - AMPK) e na regulação das vias de utilização da glicose e do metabolismo energético; apresentando um papel importante na disponibilidade de oxigênio (ou seja, regulação da respiração, através da ação da SCO2) e na resposta às espécies reativas de oxigênio (função antioxidante-TIGAR) (FARNEBO *et al.*, 2010; VOUSDEN & LANE, 2007).

Embora o principal mecanismo pelo qual a p53 regula esses processos seja pela ativação ou repressão transcricional de vários genes, ela pode atuar também por interações diretas, tipo “proteína-proteína”, influenciando o crescimento e a sobrevivência celular. A maneira como a p53 seleciona o tipo de resposta, pode variar de uma célula para outra, dependendo da natureza e intensidade do sinal indutor, do grau de diferenciação celular e do tipo de tecido, porém mais de uma resposta pode ocorrer no mesmo tecido (BOUCHET *et al.*, 2006; BRAITHWAITE & PRIVES, 2006; LATONEN & LAIHO, 2005; GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

Uma vez ativada, a p53 funciona como fator de transcrição que pode modular a progressão do ciclo celular, a senescência e a apoptose, além de ter um papel direto no reparo e na recombinação do DNA. Células que não apresentam o gene *TP53*, ou o apresentam inativado, não desencadeiam essas respostas e continuam a se dividir, movendo para a fase de replicação do DNA, sem que ocorram as pausas naturais do ciclo celular e haja reparo de quebras e outras lesões no DNA

decorrentes de estresse (SMEENK *et al.*, 2008; BRAITHWAITE & PRIVES, 2006).

Logo, a perda da função de p53, seja por mutação que afete o gene *TP53* (mais frequente), ou mediante uma inativação funcional da própria proteína p53 por interação com proteínas virais ou celulares (comportando-se na forma equivalente a uma mutação do gene), leva a um aumento da instabilidade cromossômica, caracterizada por um incremento na frequência de amplificações gênicas, rearranjos cromossômicos ou mutações. Como resultado desses processos pode ocorrer um acúmulo de danos genéticos que contribuem para a formação do tumor (BRAITHWAITE & PRIVES, 2006).

1.4.3 Mutações no *TP53* em Câncer de Mama

Mutações no gene *TP53* representam uma das alterações genéticas adquiridas mais comuns identificadas em cânceres humanos (JOERGER & FERSHT, 2008).

As diferentes mutações podem ser separadas segundo o seu possível papel, alterando ou não a estrutura da p53 e, conseqüentemente, sua função. Estas alterações podem ser do tipo que resultam em troca de aminoácido ou troca de sentido (*missense*), não importando a sua localização na molécula protéica (podendo ser o domínio de ligação ao DNA); mutações que provocam alteração do quadro de leitura (*frameshift*, devido a deleções e inserções – indels – de nucleotídeos); mutações sem sentido (*nonsense*, com formação de códon de parada) e mutações que possivelmente não provocam alteração na estrutura da proteína (silenciosas, devido ao código genético ser degenerado, e aquelas localizadas em íntrons que não afetem o processamento do RNA) (KLUG *et al.*, 2010).

Mutações nesse gene são caracterizadas por uma alta prevalência de mutações pontuais tipo *missense* que perfazem quase 88% das mutações do gene *TP53*, e são encontradas principalmente nos éxons 5 a 8 que codificam os aminoácidos 126-306 da proteína p53, correspondentes ao domínio de ligação da p53 ao DNA (FIGURA 15).

Cerca de 30% dessas mutações estão localizadas nos seis códons *hotspots* (175, 245, 248, 249, 273 e 282) (FIGURA 16) e têm sido detectadas em quase todos os tipos de câncer (FARNEBO *et al.*, 2010; ROSSNER *et al.*, 2009; McKINNEY & PRIVES, 2007; MOURA-GALLO *et al.*, 2005; SOUSSI *et al.*, 2005; BORRESEN-DALE, 2003; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; MARTIN *et al.*, 2001). Fora dessa região, as mutações *missense* representam apenas 40%, sendo a maior

parte representada pelas mutações *nonsense* ou *frameshift* (OLIVIER *et al.*, 2010). Além disso, a região N-terminal, que apresenta o domínio de transativação e a região C-terminal, que contém os sítios regulatórios, são regiões raramente mutadas, onde se observam menos de 2% das mutações no gene *TP53* (BOUCHET *et al.*, 2006).

A alta frequência de mutações somáticas nos códons *hotspots* pode se explicada por dois fatores. Primeiro, por meio de um processo mutagênico endógeno. Segundo, seleção funcional (GUIMARAES & HAINAUT, 2002).

Cinco dos seis códons *hotspots* abrangem sítios CpG nos quais as citosinas são frequentemente metiladas, e sua desaminação espontânea induz a mutações do tipo transições C:T nesses dinucleotídeos. Entre as substituições de base-única, aproximadamente 25% são substituições C:G>T:A nos sítios CpG (OLIVIER *et al.*, 2010; GUIMARAES & HAINAUT, 2002; OLIVIER & HAINAUT, 2001; PFEIFER, 2000).

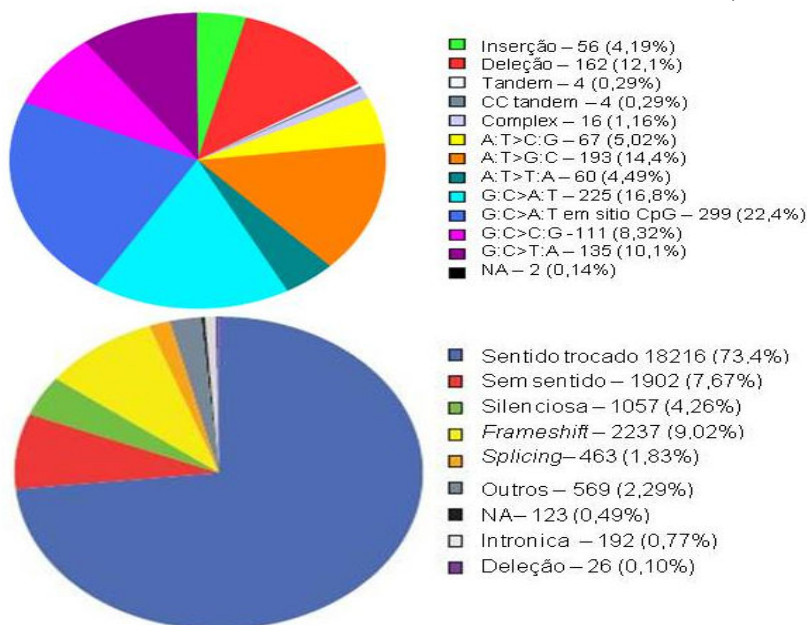


FIGURA 15: Proporção dos diferentes tipos de mutações somáticas de gene *TP53* encontradas nos cânceres humanos. 86% das mutações estão situadas no domínio de ligação ao DNA (correspondente aos códons 125-300), sendo que destas a maior parte são mutações *missense* (88%) (abaixo). Padrão de mutação em câncer de mama (acima) (Fonte: modificado de OLIVIER *et al.*, 2010; IARC, 2010).

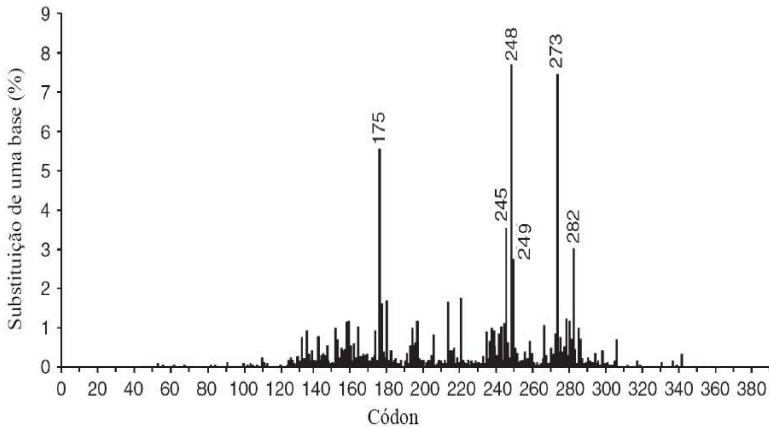


FIGURA 16: Distribuição das mutações somáticas por substituição de base simples do gene TP53. As barras pretas indicam os códons hotspots (Fonte: IARC, 2010).

O câncer de mama esporádico apresenta um perfil de mutações muito similar a outros tipos de câncer, porém com menos transversões G:C>T:A e mais transições A:T>G:C. O padrão de mutações na linhagem germinativa do *TP53* observado em famílias com história de múltiplos cânceres (Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), Síndrome tipo Li-Fraumeni ou com outra história familiar) difere daquele encontrado no câncer de mama esporádico por apresentar um alta prevalência de G:C>A:T nos sítios CpG, e, pela baixa frequência de transversões G:C>T:A e transições G:C>A:T nos sítios não CpG. A ausência de transversões de bases G:C e o excesso de mutações nos pares de base A:T, em mutações na linhagem germinativa de *TP53*, sugere que a presença de tais mutações em padrão somático pode ser consequência de um processo mutagênico endógeno que ocorre especificamente nas células da mama e pode ser induzida em resposta a exposição a carcinógenos ambientais (IARC, 2010; MOURA-GALLO *et al.*, 2005; 2004; OLIVIER & HAINAUT, 2001).

Adicionalmente, quase todos os códons frequentemente mutados são essenciais na interação entre a p53 e DNA alvo (códons 245, 248 e 273), ou na conformação da proteína (códons 175, 249 e 282). Logo, mutações nesses resíduos resultam em uma proteína com diminuição da afinidade pelo DNA, incapaz de reconhecer seus genes-alvo e transativá-los (ocasionando a perda – parcial ou total - da função da p53)

e comprometendo seriamente a habilidade da célula responder ao estresse genotóxico o que é crucial para a função supressora tumoral da p53. Essa perda de função da p53 é frequente entre mutantes *missense*, mas pode ser devida a mutações *nonsense*, erros durante o *splicing*, bem como deleções no gene. No entanto, todas as mutações não são funcionalmente equivalentes, de modo que tem sido proposto que o exato grau de perturbação funcional (funcional, parcialmente funcional ou não-funcional) das funções da p53 tipo selvagem dependem da posição da mutação na proteína. No caso das mutações *hotspots*, todas apresentam perda de função, porém o grau de perda é variável e alguns mutantes podem manter a atividade parcial de transcrição de genes-alvo (OLIVIER *et al.*, 2010; BROSH & ROTTER, 2009; MCKINNEY & PRIVES, 2007; SOUSSI, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007; SZYMANSKA & HAINAUT, 2003; GUIMARAES & HAINAUT, 2002; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; OLIVIER & HAINAUT, 2001).

Oitenta e cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), foram identificados no gene *TP53*. A maioria (90%) desses polimorfismos estão localizados em íntrons, fora de sítios de *splicing* ou em éxons não-codificantes. Entre os polimorfismos encontrados nas regiões codificadoras (éxons) do gene *TP53*, 3 tem sido bastante estudados, sendo que destes apenas um resulta em mudança de aminoácido podendo afetar a função da proteína, e foi associado ao câncer de mama (IARC, 2010; OLIVIER *et al.*, 2010; SOUSSI & WIMAN, 2007; PIETSCH *et al.*, 2006). O polimorfismo está localizado no **códon 72** (éxon 4) e resulta na mudança de uma arginina para prolina (*P72R*) (GUIMARAES & HAINAUT, 2002; PIETSCH *et al.*, 2006). O alelo *P72* apresenta uma distribuição bastante heterogênea na população em geral, com uma frequência de 17% em populações escandinávias e de 63% em populações nigerianas. Curiosamente, este polimorfismo é distribuído ao longo de um gradiente norte/sul, no hemisfério norte, sendo que o alelo arginina (*R72*) é mais freqüente no Norte da Europa e nos EUA (40-80%), enquanto que a prevalência do alelo prolina (*P72*) aumenta perto do Equador.

Existem vários estudos que sugerem que este polimorfismo pode ter um impacto funcional, uma vez que ele ocorre em na região rica em prolina envolvida supressão de crescimento e funções apoptóticas da proteína p53 (OLIVIER *et al.*, 2010; SOUSSI & WIMAN, 2007; SOUSSI, 2007; PIETSCH *et al.*, 2006; GUIMARAES & HAINAUT, 2002). Em tumores com alta frequência de mutações em *TP53*, a variante *R72* pode estar associada com pior prognóstico, enquanto em

tumores com baixa frequência de mutações em *TP53* a variante *P72* pode expressar este fenótipo em função da diminuição da função apoptótica (SOUSSE & WIMAN, 2007).

Diferentes frequências de mutações são descritas para portadores de diferentes alelos polimórficos do códon **72** de *TP53*. Tumores de mama em pacientes homocigotos para o alelo *R72* apresentam uma maior frequência de mutações em *TP53* comparados aos homocigotos *P72* (28,5% X 3,8%) (BORRESEN-DALE, 2003). O alelo *R72* foi considerado um candidato de baixa penetrância, na suscetibilidade ao câncer de mama, enquanto *P72* (em homocigose) associado ao risco aumentado da doença. A ausência de contribuição do polimorfismo *R72P* para o câncer mamário também foi relatada. Por outro lado, tem sido sugerida a associação do alelo *R72* em homocigose em múltiplos cânceres, especialmente aqueles relacionados à família *BRCA1/2* (TOMMISKA *et al.*, 2005).

Embora a maior parte das mutações afete a região central da proteína, 30% delas envolvem os seis códons *hotspots*, os outros 70% de mutações se distribuem pelos demais códons (MOURA-GALLO *et al.*, 2005; GUIMARAES & HAINAUT, 2002). Um exemplo é a superexpressão da transição A>G (TAC>TGC) no códon 163. Este códon é raramente mutado em muitos cânceres, mas é responsável por mais de 2% das mutações em câncer de mama e é considerado um códon *hotspot* para *TP53* em cânceres que carregam mutações germinativas em *BRCA1/2* (OLIVIER & HAINAUT, 2001; LACROIX *et al.*, 2006).

Além disso, estudos dos polimorfismos **códon 72** (Arginina>Prolina), **íntron 3** (inserção/deleção de 16pb) e **íntron 6** (substituição de A>G e G>C) sugerem um fator de risco de câncer de mama (PIETSCH *et al.*, 2006; BORRESEN-DALE, 2003; KESHAVA *et al.*, 2002; WESTON *et al.*, 1997).

Em relação ao câncer de mama, cerca de 20-35% dos tumores expressam mutações no gene *TP53* sendo que a maioria destas mutações é de origem somática (LACROIX *et al.*, 2006). No entanto, podem ocorrer mutações germinativas de *TP53* em altas proporções em indivíduos com a Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome de suscetibilidade ao câncer, e que confere um risco aumentado para o câncer de mama (hereditário). Esta observação suscita um importante papel para a inativação de p53 na carcinogênese mamária (ROBBINS, 1996 *apud* ABREU, 2008; GASCO *et al.*, 2002).

A inativação do gene *TP53* é essencialmente devida a pequenas mutações (*missense* e *nonsense*, ou inserções/deleções de muitos

nucleotídeos), que levam a expressão da proteína mutante (90% dos casos) ou ausência da proteína (10% dos casos), mas em muitos casos está associada à perda do braço curto do cromossomo 17 por um mecanismo denominado perda de heterozigose (SOUSSI, 2007). Mutações no gene *TP53* podem contribuir com até 17% dos casos de câncer familiar. Estudos no sul do Brasil identificaram muitas famílias com uma mutação fundadora, *R337H* (mudança de arginina para histidina) (OLIVIER *et al.*, 2010).

A proteína mutante *R337H*, localizada no domínio de oligomerização acarreta perda parcial da função. Análises químicas revelaram que esta proteína é altamente sensível ao pH fisiológico levando a mudanças na conformação da proteína devido a alterações na ligação de hidrogênio entre dois monômeros, dependendo do estado protonado desta (SOUSSI, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007). Esta mutação foi encontrada, especificamente associada ao carcinoma adreno-cortical pediátrico no sul do Brasil e está relacionada com a Síndrome de Li-Fraumeni (SOUSSI, 2007).

Estudos de carcinomas mamários envolvendo pacientes com LFS demonstraram que a predisposição para a malignidade resulta da inativação de um dos alelos que se dá por perda de heterozigose, observada em aproximadamente metade dos tumores e, da necessidade de apenas mais uma mutação somática envolvendo o outro alelo para a perda da função de supressor tumoral. Nas famílias com LFS, o câncer de mama é responsável por aproximadamente 43% de todas as malignidades entre as mulheres (ROBBINS, 1996 *apud* ABREU, 2008; GASCO *et al.*, 2002). Modificações em outros genes relacionados às vias de p53 também podem resultar em sua inativação, incluindo alterações no gene *ATM*, *BRCA1* e *MDM-2* (GASCO *et al.*, 2002). Em adição, tumores esporádicos, portando uma mutação somática de *TP53*, apresentam perda de heterozigose em aproximadamente 70% dos casos (BORRESEN-DALE, 2003), indicando que mutações de ganho de função ou mutações negativas dominantes podem ocorrer (FIGURA 17).

Além da perda de função, mutações podem atribuir a p53 mutante a atividade de **dominante negativo**, isso ocorre pela hetero-oligomerização com p53 selvagem, expressa pelo segundo alelo (p53 mutante inativa a proteína p53 selvagem), formando um heterotetrâmero com atividade comprometida na ligação ao DNA. Exemplos de mutantes com atividade dominante negativo: R175H, R248W/Q, R249S e R273H (OLIVIER *et al.*, 2010; BROSH & ROTTER, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; SOUSSI, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007;

GUIMARAES & HAINAUT, 2002; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; van OIJEN & SLOOTWEG, 2000).

Mutantes com **ganho de função** promovem a transativação de genes que normalmente não são ativados pela p53 selvagem e que irão atuar na inativação de genes com atividade supressora de tumor ou podem exercer funções mitogênicas pela estimulação de fatores de crescimento ou receptores de fatores de crescimento. Dois exemplos são os genes *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e *c-myc* que são ativados por certos mutantes de p53 (V143A, R175H, R248W, R273H, D281G (OLIVIER *et al.*, 2010; BROSH & ROTTER, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; SOUSSI, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007; GUIMARAES & HAINAUT, 2002; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; van OIJEN & SLOOTWEG, 2000).

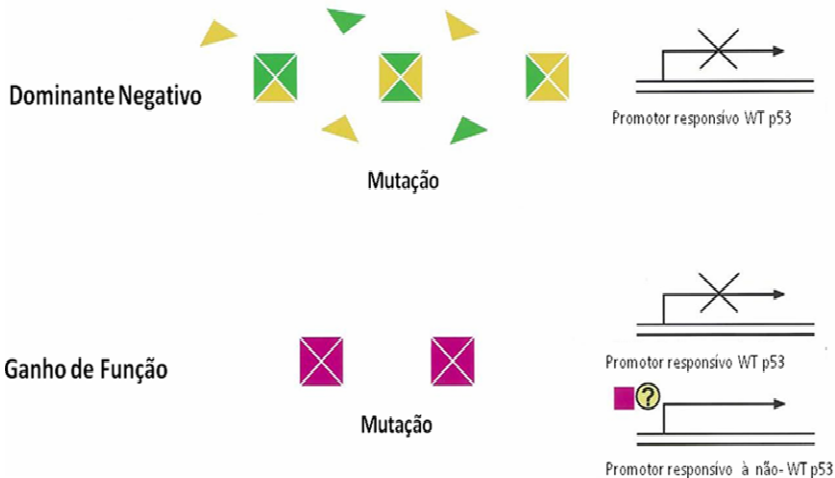


FIGURA 17: Mecanismos propostos para o papel das mutações da proteína p53 na tumorigênese. Dominante negativo: alguns mutantes p53 (amarelo) oligomerizam com p53 tipo-selvagem (WT) (verde) e inibem a ativação transcricional de maneira negativa-transdominante. Ganho de função: Alguns mutantes p53 (roxo) possuem novas funções não compartilhadas pelo tipo selvagem. Esses mutantes, não ativam genes alvo de p53 normalmente, mas sim um grupo diferente de genes, como *MDR1* e *c-myc*. (Fonte: modificado de CADWELL & ZAMBETTI, 2001).

Outros exemplos são os genes: *MDR1* (*Multiple Drug Resistance*) associado à quimioresistência (*V143A*, *R175H*, *R248W*, *R249S*, *R273H*, *D281G*), *BAG-1* envolvido na sobrevivência celular e *VEGF* (*Vascular*

Endothelial Growth Factor) com função angiogênica, expresso pelo mutante *R175H*. Além disso, p53 mutante pode formar complexos com a p63 e p73, inibindo a capacidade da transativação destas proteínas que poderiam impedir a formação do câncer. As mutantes *R175H*, *R248W* e *R273H* estão associadas a este fenótipo, pois ao serem expressas em linhagens de células que não apresentam p53, foi observado um aumento do potencial tumorigênico. Dessa forma, embora *TP53* selvagem seja um gene supressor de tumor, algumas formas mutantes podem se comportar como oncogenes (OLIVIER *et al.*, 2010; BROSH & ROTTER, 2009; JOERGER & FERSHT, 2008; SOUSSI, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007; GUIMARAES & HAINAUT, 2002; CADWELL & ZAMBETTI, 2001; van OIJEN & SLOOTWEG, 2000).

1.4.4 Valor prognóstico das mutações do TP53 no Câncer de Mama

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

Um estudo de meta-análise mostrou que mutações afetando aminoácidos críticos para ligação da p53 ao DNA foram associadas com cânceres mais agressivos, enquanto mutações nulas e outras mutações *missense* foram associadas com fenótipo clínico indeterminado (GASCO *et al.*, 2002). Mutações *missense* no códon 179 e R248W (domínio de ligação ao DNA) foram associadas à reduzida sobrevivência o que pode estar relacionado ao ganho de função da p53 mutada (papel oncogênico) fazendo com que o tumor apresente características mais agressivas (OLIVIER *et al.*, 2006; MOURA-GALLO *et al.*, 2004). Enquanto que, as mutações G245S e Y220C foram associadas com melhor sobrevida em comparação com outras mutações *missense*. Outros pontos de mutação considerados *hotspots* para o câncer da mama (R175H, R248Q, R273H/C, códons 163, 249 e 282), foram associados com taxas de mortalidade similares as das mutações *missense* não-*hotspots* (OLIVIER *et al.*, 2006). Espera-se que cânceres que apresentem mutação no gene *TP53* se comportem de forma mais agressiva do que aqueles que preservam a função p53 normal, uma vez que células sem função p53 normal têm uma seletiva vantagem de

crescimento e são mais resistentes à radiação ionizante e alguns fármacos anticancerígenos do que as células com proteína p53 do tipo selvagem (HILL & SOMMER, 2002).

Outras investigações buscaram identificar o estágio da tumorigênese da mama na qual a alteração da p53 ocorre (consequência de mutação do gene *TP53*). A microdissecação de material do tumor mostrou que o CDIS de baixo grau é essencialmente desprovido de mutações, enquanto que estas foram mais comuns em CDIS de alto grau (30 - 40%) (BORRESEN-DALE, 2003; GASCO *et al.*, 2002), corroborando a informação de que mutações em *TP53* são mais frequentes em tumores avançados (OLIVIER *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2004). Entretanto, isso não é uma regra, visto que mutações em *TP53* podem estar presentes em estágios precoces, particularmente em tumores agressivos, como é o caso dos tumores triplo-negativos (expressão de ER -, PR- e HER2 -) em câncer de mama, levando a rápida progressão da doença a estágios mais avançados (OLIVIER *et al.*, 2010; OLIVIER & HAINAUT, 2001).

Pode ainda existir uma correlação entre etnia e estágio da doença. Em estudo com a população brasileira, NAGAI *et al.* (2003) encontraram que pacientes afro-americanas apresentavam lesões mais avançadas que as de origem européia.

Embora a frequência de mutações do *TP53* em câncer de mama seja de aproximadamente 20%, como p53 participa de muitas vias celulares, defeitos nessas vias, somáticos ou herdados, podem influenciar qualitativamente ou quantitativamente a função de *TP53*. Um exemplo dessa relação envolve *BRCA1* que atua no *checkpoint* do ciclo celular e no reparo de DNA, garantindo a integridade do genoma. Mutações germinativas nesse gene aumentam o risco de desenvolver câncer de mama. Foram identificadas, em câncer familiar, altas taxas de mutações em *TP53*, mas que também são portadores de mutações germinativas em *BRCA1*. Isso não é surpreendente, uma vez que mutações nesse gene estão associadas à instabilidade genética e reparo ineficiente do DNA (SOUSSI & WIMAN, 2007; BORRESEN-DALE, 2003; GASCO *et al.*, 2002). Foi observado também, que pacientes mais jovens apresentam maior frequência de mutações de *TP53* em seus tumores, possivelmente refletindo a alta proporção de mutações em *BRCA1/2* (BORRESEN-DALE, 2003).

No entanto, distintos espectros de mutações em *TP53* ocorrem em outros carcinomas, como é o caso dos carcinomas medulares clássicos da mama nos quais as mutações de *TP53* ocorrem em 100% dos casos; e dos tumores inflamatórios da mama, nos quais a frequência de mutações

em *TP53* é baixa (SOUSSE & WIMAN, 2007; BORRESEN-DALE, 2003; GASCO *et al.*, 2002). De acordo com OLIVIER *et al.* (2006), houve uma relação linear entre o tamanho do tumor e a frequência de mutações do gene *TP53*, e uma forte associação entre a presença de uma mutação do gene *TP53* em tumores de alto grau e linfonodos positivos, o que está de acordo com os dados disponíveis em <http://www-p53.iarc.fr/Somatic.html>. Estudos observaram que a frequência de mutações no gene *TP53* é em geral consideravelmente mais baixa (15-18%) em pacientes com tumores pequenos e linfonodos negativos, do que em pacientes com linfonodos positivos, tumores grandes e doença avançada (BORRESEN-DALE, 2003). OLIVIER *et al.* (2006), em seu trabalho, descrevem que mutações no gene *TP53* foram mais prevalentes em pacientes que apresentaram tumores de histologia ductal e medular, de alto grau, grande tamanho, e com linfonodos positivos.

Numerosos estudos vêm mostrando uma relação positiva entre a presença de mutações em *TP53* e prognóstico para o câncer de mama, sendo que a presença de mutações tende a indicar um pior prognóstico (MOURA-GALLO *et al.*, 2004; BORRESEN-DALE, 2003). Tumores grandes, com alto grau histopatológico e linfonodos positivos foram associados com elevadas taxas de mortalidade. Pacientes com bom prognóstico apresentavam tumores de baixo grau histológico, menores que 5cm e sem invasão linfonodal (OLIVIER *et al.*, 2006).

Mutações em regiões conservadas, códon 117-142 e códon 270-286, também foram associadas com pior prognóstico (LEVINE & OREN, 2009; LACROIX *et al.*, 2006). NAGAI *et al.* (2003) observaram que mutações em *TP53*, afetando a ligação de p53 ao DNA, estão associadas com menor sobrevivência. Estudos confirmam que as mutações no gene *TP53* conferem uma pior sobrevida global e livre de doença no câncer de mama e que este efeito é independente de outros fatores de riscos. Em vários dos estudos, a presença de mutações no gene *TP53* foi o único indicador prognóstico para recorrência e morte (BORRESEN-DALE, 2003). A sobrevida em um período de 10 anos foi 60% menor naqueles que apresentaram mutações em *TP53* comparados com pacientes sem mutações (OLIVIER *et al.*, 2006). O pobre prognóstico para pacientes com mutações específicas no gene *TP53* pode refletir mutações que têm um ganho de função ou um fenótipo dominante negativo particularmente forte (BORRESEN-DALE, 2003).

Diferenças étnicas nas frequências de mutações do gene *TP53* também podem exercer um impacto na sobrevida de pacientes com câncer de mama. Estudos relatam que pacientes afro-americanas possuem uma frequência maior de alterações neste gene quando

comparadas a pacientes americanas de origem europeia e apresentam um pior prognóstico da doença em relação a estas (CONWAY *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. No Brasil, esta neoplasia é a primeira causa de óbito por câncer entre mulheres (INCA) (BRASIL, 2009). Nesse contexto, estudos epidemiológicos são de grande importância para a identificação de fatores etiológicos relacionados ao desenvolvimento tumoral, subsidiando o estabelecimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamentos mais eficientes.

Genes que codificam proteínas participantes de processos biológicos cruciais para o organismo, relacionados direta ou indiretamente ao controle da divisão celular, ao apresentarem mutações, podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, incluindo o de mama.

Dentre estes, o gene *TP53* é um forte candidato a causar variação de suscetibilidade ao câncer de mama e dar indícios sobre a progressão da doença. Isto porque, mutações nesse gene são as alterações genéticas mais frequentes em cânceres humanos, o que sugere seu papel preventivo no desenvolvimento tumoral, através do controle de crescimento e sobrevivência celular (FARNEBO *et al.*, 2010; BRAITHWAITE & PRIVES, 2006; LACROIX *et al.*, 2006; BOND *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram avaliadas mutações dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*, através de uma triagem das mutações pela técnica de PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), comparando as alterações entre o sangue e o tumor das pacientes e destas com mulheres saudáveis (denominadas grupo controle), desta forma, auxiliando no prognóstico da doença, e principalmente na decisão terapêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo identificar e comparar o perfil mutacional do gene *TP53* em mulheres diagnosticadas com tumor maligno de mama e mulheres saudáveis, do estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a frequência de mutações do gene *TP53* (éxons 5, 6, 7 e 8), em mulheres diagnosticadas com tumor maligno de mama residentes no Estado de Santa Catarina.

- ✓ Identificar genótipos de risco para o câncer de mama, através do estudo das mutações do gene *TP53* (éxons 5, 6, 7 e 8), avaliando mulheres portadoras de câncer de mama e mulheres saudáveis residentes no Estado de Santa Catarina.

- ✓ Analisar possíveis associações entre a presença de mutações e fatores de risco clássicos, tais como: idade, ancestralidade informada, história familiar de câncer de mama, paridade, amamentação, menarca, menopausa, consumo de tabaco e álcool.

- ✓ Aplicar a técnica de PCR-SSCP na triagem de mutações dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*.

- ✓ Sequenciar as mutações triadas pela técnica de PCR-SSCP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Câncer de Mama: Avaliação de Parâmetros Informativos e Moleculares para Diagnóstico e Prognóstico no Estado de Santa Catarina”, aprovado pelos comitês de ética da UFSC (CEP parecer n° 349/05 de 26/06/2006) e Nacional (CONEP parecer n° 027/2006, registro 13312 de 24/01/2007), e financiado por dois editais do CNPq: (1) Edital MS/CNPq/FAPESC/SES-PPSUS (contrato n° 14813/2005-0), sob coordenação da Dra. Íliada Rainha de Souza, da UFSC, (2) Edital Neoplasias (Proc.n° 400907/2005-4) coordenado pela Dra. Claudia Vitória de Moura-Gallo, da UERJ, em colaboração com o grupo de pesquisa Genética Humana Aplicada, da UFSC, sendo integrantes Dra. Íliada Rainha de Souza e Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

A amostra de pacientes foi constituída por 63 mulheres diagnosticadas com carcinomas mamários esporádicos ainda não submetidas à quimioterapia ou radioterapia, atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), entre os anos de 2004 e 2010. A amostra de controles foi composta de 67 mulheres saudáveis, coletadas entre mulheres submetidas a exames de rotina no laboratório de análises clínicas, doadoras do banco de sangue do HU-UFSC, voluntárias do Hospital Florianópolis ou ainda, alunas do Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC. O tamanho amostral foi reduzido para 59 e 64 no grupo de pacientes e controle, respectivamente, em virtude da não amplificação de algumas amostras.

As participantes foram submetidas a entrevistas baseadas em questionários estruturados pela equipe de pesquisadores do projeto, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Íliada Rainha de Souza e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), antes da coleta do material biológico (ANEXOS). Posteriormente, a análise dos prontuários, no HU-UFSC, do grupo de pacientes foi realizada para coleta dos dados epidemiológicos e clínico-patológicos.

Foram obtidas amostras de sangue periférico tanto das pacientes como dos indivíduos controle. Das pacientes também foram coletadas amostras de tecido tumoral. Estas amostras foram coletadas logo após a cirurgia para a remoção do tumor, que foi encaminhado ao médico

patologista do HU e retirada uma pequena porção representativa do tecido tumoral para os estudos moleculares aqui propostos.

Os dados epidemiológicos coletados, durante a entrevista e preenchimento do questionário, considerados para a comparação dos dois grupos amostrais foram: idade, ancestralidade informada, paridade, amamentação, hábito tabagista, consumo de álcool, história familiar de câncer de mama em primeiro grau e idade da menarca e menopausa.

4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo foram coletados cerca de 8mL de sangue periférico armazenados em tubos - Vacutainer® - com anticoagulante (EDTA 1mg/mL).

As amostras de tecido fresco tumoral, de todos os pacientes considerados neste trabalho, foram cedidas pelo Setor de Patologia do HU e armazenadas em nitrogênio líquido imediatamente após a cirurgia.

Todas as amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da UFSC.

4.3 CONSERVAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Cada indivíduo recebeu um número em série de acordo com a data de entrada no banco de DNA do LAPOGE e esse número foi utilizado para todos os procedimentos e análises moleculares. Com este número foi possível acessar todos os dados epidemiológicos de cada amostra no banco de dados do LAPOGE.

As amostras de sangue transportadas ao LAPOGE foram submetidas à centrifugação a 3000rpm (centrífuga EXCELSA II 206BL), durante 20 minutos, o que resultou na separação do sangue em três fases: a fase superior contendo o plasma, a fase intermediária contendo os leucócitos (*buffy coat*) e a fase inferior contendo os eritrócitos, os quais foram armazenados separadamente em microtubos de 1,5mL e estocados a -20°C. A fase de *buffy coat* foi utilizada para a extração de DNA.

Para as amostras de tumor, foram pesados cerca de 20mg de tecido fresco e estocados em microtubos de 1,5mL, devidamente identificados, e mantidos em freezer (-20°C) até o momento da extração do DNA.

4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

4.4.1 Extração e purificação de DNA genômico do sangue periférico

A extração do DNA genômico do sangue periférico foi realizada de acordo com o método proposto por SAMBROOK (2001). Esse método consiste no rompimento mecânico químico das células, degradação de proteínas, precipitação e purificação do DNA que se mantém conservado.

Em microtubos de 1,5mL adicionou-se 50 μ L de *buffy coat* e 300 μ L de tampão de extração SEB (“*Stain Extraction Buffer*”) (Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 10mM pH 8,0; NaCl 100mM; SDS 2%) para lise da membrana e organelas celulares e 10 μ L de Proteinase K (20mg/mL), uma protease que cliva ligações peptídicas permitindo a remoção de proteínas. O conteúdo foi homogeneizado em *vortex* e levado ao banho-maria por 12 horas a 65°C. Após esse período, foi adicionado aos microtubos 300 μ L de Clorofane (Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico) também homogeneizados em *vortex* e centrifugados por 7 minutos a 12.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415D).

Após a centrifugação o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos microtubos. Adicionou-se então, 300 μ L de clorofórmio, homogeneizou-se em *vortex* e centrifugou-se por 7 minutos a 12.000rpm. O sobrenadante foi novamente recuperado e transferido para novos microtubos, onde foram adicionados álcool isopropílico absoluto em volume equivalente ao volume da amostra e acetato de sódio (3M) em volume equivalente a 10% do volume recuperado. O conteúdo dos microtubos foi homogeneizado por inversão e levado ao *freezer* (-20°C) por 1 hora.

Após esse período centrifugou-se os microtubos por 10 minutos a 13.000rpm a 0°C (centrífuga Eppendorf 5415R). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se aos microtubos 300 μ L de etanol 70%, homogeneizou-se em *vortex* e centrifugou-se por 2 minutos a 13.000rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o último passo.

Após o descarte do sobrenadante, os microtubos foram levados ao banho-seco por 1 hora a 65°C e, após esse período, adicionou-se 100 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 0,1mM; pH 7,5) para solubilização do DNA.

4.4.2 Extração e purificação de DNA genômico do tumor

A extração de DNA da amostra do tumor foi feita utilizando *Genomic Prep® Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (AMERSHAM 27-5237-01) e de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Essa extração envolve 5 etapas, podendo-se utilizar o tecido fresco ou congelado.

Em uma primeira etapa foi feita a lise celular, para isso 10 a 20mg de tecido tumoral congelado foram imersos em 600 μ L solução de *LISE I* [TRIS-HCl (0,01M e pH 7,6), Sacarose (0,36M); MgCl₂ (0,005M) e TRITON X – 100 (1%)], previamente resfriada. Esta mistura foi homogeneizada. Acrescentou-se 3 μ L de solução de proteinase K (20mg/mL) e as amostras foram incubadas *overnight*, a 55°C, a fim de se obter um aproveitamento máximo, ou seja, até o tecido estar completamente dissolvido.

A segunda etapa consistiu no tratamento do produto lisado com RNase. Para isso, adicionou-se 3 μ L da solução de RNase ao produto da primeira etapa, foi feita a homogeneização e as amostras foram incubadas por 15 a 60 minutos, a 37°C.

Na terceira etapa, em que aconteceu a precipitação das proteínas, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, acrescentaram-se 200 μ L da solução de precipitação de proteínas® ao produto da segunda etapa e as amostras foram centrifugadas a 16.000rpm durante 3 minutos.

Para a etapa seguinte, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um microtubo de 1,5mL, limpo e identificado, contendo 600 μ L de isopropanol 100%. As proteínas precipitadas que formaram um *pellet* firme foram descartadas.

Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16.000rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 600 μ L de etanol 70% para precipitar o DNA, realizou-se nova centrifugação; desprezou-se o sobrenadante. Depois de seco à temperatura ambiente, o DNA aderido à parede do tubo foi solubilizado em 100 μ L (solução de hidratação do DNA) e armazenado a -20°C.

4.4.3 Quantificação e verificação da qualidade do DNA extraído

Após a extração de DNA de sangue e tecido tumoral, uma alíquota foi diluída cerca de 10 vezes e o DNA foi quantificado através da absorbância medida em 260nm (detecção de ácidos nucleicos) e 280nm (detecção de proteínas) em espectrofotômetro (Amersham

Pharmacia Biotech). A razão entre A_{260} e A_{280} deve ser igual ou maior a 1,75 indicando a pureza do material (SAMBROOK *et al.*, 2001). Então, a concentração de DNA foi calculada através da expressão matemática:

$$\frac{1 \text{ DO}_{260}}{\text{Solução DNA DO}_{260}} = \frac{\text{50ng/}\mu\text{L de DNA}}{\text{X}}$$

$$\text{X x diluição} = \text{concentração do DNA (ng/}\mu\text{L)}$$

Após leitura da densidade óptica do DNA foram feitas alíquotas de uso na concentração de 20ng/ μ L, utilizando-se tampão TE.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS 5, 6, 7 E 8 DO GENE *TP53* E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%

A reação de PCR foi usada para amplificar quatro regiões específicas do gene *TP53* (éxons 5 a 8).

A PCR é uma técnica que possibilita a síntese enzimática *in vitro*, de sequências-alvo do gene que se pretende estudar, possibilitando a obtenção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA, através de ciclos de amplificação.

Para isso, uma mistura reacional de 25 μ L (MIX) foi feita para a PCR dos éxons 5 a 8, seguindo o protocolo sugerido por ORITA *et al.* (1989) composta de: 2,5 μ L de Tampão de reação 10X [Tris-HCl 75mM pH 9,0, KCl 50mM e (NH₄)₂SO₄ 20mM (BIOTOOLS)], 0,75 μ L demgCl₂ [50mM (BIOTOOLS)], DNA polimerase *Tth* [0,5U (BIOTOOLS)], 0,4 μ L de mistura a [10mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - AMERSHAM)], 0,67 μ L de cada iniciador (50 μ M), água ultra-pura estéril e 60ng de DNA genômico. Os reagentes e os iniciadores utilizados estão representados na TABELA 2 e TABELA 3, respectivamente.

TABELA 2: Protocolo para as reações de PCR para os éxons 5 a 8 do gene *TP53*.

Reagentes	Quantidades
Tampão 10X	2,5µL
MgCl₂ 50mM	0,75µL
dNTP 10mM	0,4µL
Primer F 50µM	0,67µL
Primer R 50µM	0,67µL
Água ultra-pura	16,91µL
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,1µL
DNA (20ng/µL)	3,0µL
Volume Total	25µL

TABELA 3: Iniciadores específicos aos éxons do gene *TP53* estudados utilizados para amplificação de cada uma das regiões de interesse durante a reação de PCR. Incluído também o tamanho do fragmento amplificado e a referência bibliográfica.

Gene <i>TP53</i> ÉXON	Iniciador	Sequência do iniciador	Tamanho do fragmento	Referência
5	senso	5' TGTTTGTTTCTTTGCTGCCGTGT 3'	303pb	ORITA <i>et al.</i> (1989)
	antisenso	5' CCCTGTCGTCTCTCCAGCCC 3'		
6	senso	5' GGGGCTGGAGAGACG ACAGG 3'	231pb	ORITA <i>et al.</i> (1989)
	antisenso	5' AACCACCCCTTAACCCTCCT 3'		
7	senso	5' CTCATCTGGGCCTGTGT 3'	204pb	ORITA <i>et al.</i> (1989)
	antisenso	5' GGGTCAGAGGCAAGCAGAG 3'		
8	senso	5' CTGCCTTTGCTTCTCTTTT 3'	255pb	ORITA <i>et al.</i> (1989)
	antisenso	5' GAGGCAAGGAAAGGTGATAA 3'		

As amplificações dos éxons 5 a 8 foram realizadas no termociclador Mastercycler Eppendorf®, com as seguintes condições de ciclagem: (A) desnaturação inicial: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos. (B) condições dos ciclos: 35 ciclos, cada um consistindo em três etapas: (i) desnaturação a 94°C por 30 segundos; (ii) anelamento dos iniciadores, para os éxons 5 e 6 utilizou-se 63°C por 1 minuto; para o éxon 7 foram 62°C por 1 minuto e para o éxon 8 foram 60°C por 1 minuto; e (iii) extensão a 72°C por 1 minuto. (C) extensão final: de 1 ciclo de a 72°C por 10 minutos. Os programas aos quais cada PCR foi submetida estão listados na TABELA 4.

TABELA 4: Programas utilizados para as reações de PCR para os éxons 5 a 8 do gene *TP53*.

Gene <i>TP53</i> ÉXON	Programas
5	1 ciclo: 94°C por 5 min 35 ciclos: 94°C por 30 seg, 63°C por 1 min e 72°C por 1 min 1 ciclo 72°C por 10 min
6	1 ciclo: 94°C por 5 min 35 ciclos: 94°C por 30 seg, 63°C por 1 min e 72°C por 1 min 1 ciclo 72°C por 10 min
7	1 ciclo: 94°C por 5 min 35 ciclos: 94°C por 30 seg, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min 1 ciclo 72°C por 10 min
8	1 ciclo: 94°C por 5 min 35 ciclos: 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min 1 ciclo 72°C por 10 min

Para cada conjunto de reações de PCR foram utilizados: um controle negativo e um controle positivo. O controle negativo consistiu em um microtubo contendo todos os reagentes da mistura de reação exceto DNA genômico para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação. O controle positivo de cada éxon consistiu de amostras de diferentes indivíduos, com mutação conhecida para cada um dos 4 éxons analisados. As amostras de DNA genômico dos controles positivos foram cedidas pela Prof^a. Dr^a. Cláudia Vitória de Moura-Gallo, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ.

Os produtos da PCR tiveram sua amplificação confirmada através da visualização dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1% preparado com 0,40g de agarose (J. T. Baker), dissolvido em 40mL de TBE 0,5X (50mL de TBE 10X; 950mL de água) e corados com Gel Red (BIOSYSTEMS) diluído em DMSO (1:500, MERCK). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (BioAmerica - BIOAHS-12G) com TBE 0,5X a 100V por 20 minutos.

Foi aplicado no gel 2,0µL de cada produto de PCR misturado com 1µL de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% glicerol em água). Um padrão de peso molecular (Sharp DNA marker 100pb DNA Ladder - RBC) foi adicionado para permitir, por comparação, a confirmação do tamanho da banda amplificada.

O produto da região gênica amplificada foi visualizado sob luz ultravioleta e o resultado foi fotodocumentado (DNr Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro). Em caso de sucesso da reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, pela técnica de Polimorfismo de Conformação de DNA de Fita Simples (SSCP).

4.6 POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES (SSCP) DOS ÉXONS 5 A 8 DO GENE *TP53*

Esse método consiste em avaliar a mobilidade eletroforética diferencial de DNA unifilar em teste com estruturas secundárias (conformações) diferentes por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, com aplicação na detecção de pequenas inserções ou deleções e mutações de ponto (PONDER, 1997).

Após a amplificação do DNA, um volume de 4µL do produto de PCR foi desnaturado com solução desnaturante (formamida 95%, EDTA 20mM, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol) na proporção de 1:1. Essa mistura foi submetida à temperatura de 94°C em termociclador Mastercycler (Eppendorf) durante 10 minutos e imediatamente colocada em gelo por cerca de 5 minutos, para manter-se desnaturada. Posteriormente, aplicou-se a mesma em gel de poliacrilamida não-desnaturante 10% para a identificação dos fragmentos dos éxons 5, 7 e 8 e 14% para os fragmentos do éxon 6 (modificado de SAMBROOK *et al.*, 2001).

O gel de poliacrilamida foi preparado com 12,5mL (10%) e 17,5mL (14%) e solução mãe 29:1 (acrilamida:bisacrilamida AMRESCO®), 5mL de tampão TBE 10X (90g de Tris base; 18g de Tris-HCl; 55g de ácido bórico; 40mL de EDTA 0,5M; volume em água para 1L; pH 8,0), 43,12mL (10%) e 60,37mL (14%) água destilada, 625µL (10%) e 875µL (14%) de persulfato de amônio (0,1g/mL - usb®) e 62,5µL (10%) e 87,5µL (14%) de N’N’N’N’ tetrametiletenodiamina (TEMED- BioAgency); foi realizada pré-corrída eletroforética a 200V por 1 hora.

As eletroforeses foram feitas em voltagem constante de 3,7V/cm, com tampão TBE 0,5X em cuba de eletroforese vertical (C.B.S. Scientific CO – DASG 400). Para os fragmentos de PCR correspondentes aos éxons 5, 7 e 8 do gene *TP53* foram realizadas durante aproximadamente 14 horas e 18 horas para o éxon 6, todos à temperatura de aproximadamente 20°C.

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em 500mL de solução fixadora (ácido acético 16% e etanol 0,7%) por 20 minutos. Adicionou-se 50mL de solução de coloração de nitrato de prata 1% por 10 minutos. Em seguida foi feita uma lavagem de 10 segundos, com água destilada aquecida, o gel foi imerso em 500mL de solução reveladora (hidróxido de sódio 2,25% e formaldeído 1% v/v) até ser possível visualizar as bandas. Após a revelação, o gel foi incubado novamente na solução fixadora para interromper o processo de revelação. As imagens dos géis foram registradas pelo sistema DNr Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro, sob luz branca, e arquivadas para posterior análise.

As amostras que apresentaram um padrão diferencial de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida pela técnica de SSCP foram selecionadas para sequenciamento, realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, em colaboração com a Msc. Débora Denardin Lückemeyer.

4.6.1 Purificação do produto de PCR

Para a remoção de resíduos provenientes da PCR, foi realizada a purificação das amostras a serem sequenciadas utilizando-se isopropanol absoluto e etanol 70%.

Inicialmente adicionou-se 50µL de isopropanol 100% a temperatura ambiente ao produto de PCR. Em seguida, centrifugou-se as amostras a 14.000rpm por 30 minutos (centrífuga Eppendorf 5424), sendo o sobrenadante descartado após a centrifugação.

Posteriormente, adicionou-se 150µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se a 14.000rpm por 5 minutos e novamente descartou-se o sobrenadante. A seguir, as amostras foram incubadas durante 15 minutos a 37°C.

Finalmente, os produtos de PCR purificados foram eluídos em 15µL de água ultra-pura estéril e quantificados em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo 0,2µg/mL, em tampão TBE 1X, com o auxílio de padrão de peso molecular [HMW (*high*) feito com DNA de fago lambda (Gibco) tratado com a enzima PstI (Promega) e LMW (*low*) feito de DNA do plasmídeo pUC tratado com a enzima HaeIII (Promega)] e armazenados a -20°C para posterior sequenciamento.

As imagens destes géis foram registradas pelo sistema de fotodocumentação (DNr Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro), avaliadas

e analisadas para leitura de resultados e arquivadas para consulta posterior.

4.6.2 Sequenciamento

A base desse método é o uso de dideoxiribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), nos quais o grupo 3' - OH da desoxirribose presente em nucleotídeos normais está ausente; quando um destes nucleotídeos é incorporado em uma cadeia de DNA, a adição do nucleotídeo seguinte é bloqueada.

Para se analisar a presença e alterações no gene *TP53* foi realizado o sequenciamento tanto das amostras de sangue como das amostras de tumor, previamente identificadas com padrão eletroforético alterado por SSCP.

As reações de sequenciamento (volume final 10 μ L) foram realizadas na presença de 1 μ L cada um dos iniciadores a 5 μ mol (TABELA 5); 3,2 μ L de Pré-Mix a partir do *Kit DYEnamic® ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire) e DNA das amostras. O volume de DNA de cada amostra utilizado para a reação de sequenciamento foi variável e de acordo com a quantificação prévia em gel de agarose, sendo o volume máximo de DNA a ser utilizado de 5,8 μ L totalizando os 10 μ L de volume final. Nas amostras com volume inferior a 5,8 μ L adicionou-se água ultra-pura estéril para completar o volume final de 10 μ L.

TABELA 5: Iniciadores específicos aos éxons do gene *TP53* estudados utilizados para a reação de sequenciamento de cada uma das regiões de interesse.

Gene <i>TP53</i> ÉXON	Iniciador Senso	Iniciador Antisenso
Éxon 5*	5' CTCTCTCTAGCTCGCTAGTGGGT TGC 3'	-
Éxon 6*	-	5' AACCACCCTTAACCCC TCCT 3'
Éxon 7*	5' TGAGCTGAGATCACGCCACTG 3'	5' GGATGTGATGAGAGGTGGA TGG 3'
Éxon 8*	5' GTGGCTTCTCCTCCACCTACCTG 3'	5' CTGGGGAGAGGAGCTGG TGTTG 3'

* os éxons 5 e 6 foram sequenciados juntos, utilizando-se o seguinte jogo de iniciadores: iniciador senso do éxon 5 e iniciador

antisense do éxon 6, sendo o iniciador antisense sugerido por ORITA *et al*, 1989 e o iniciador sense desenhado com o auxílio do programa PrimerSelect (Lasergene) no LAPOGE.

* os iniciadores para os éxons 7 e 8 foram desenhados com o auxílio do programa PrimerSelect (Lasergene) no LAPOGE.

Para cada amostra foram realizadas duas reações, uma com iniciador sense e outra com o antisense. As condições térmicas utilizadas foram: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto e 20 segundos. Observa-se que os fragmentos referentes aos éxons 5 e 6 foram amplificados com os mesmos iniciadores, gerando um fragmento único, onde posteriormente foi verificada a localização de cada um dos éxons de interesse para análise.

Após a PCR, foi realizada a precipitação da reação de sequenciamento para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Para isso, adicionou-se 40 µL de isopropanol 70% a temperatura ambiente e a placa, contendo as amostras, foi homogeneizada no *vortex* a uma baixa agitação. Então, a placa foi centrifugada a 4.000rpm por 45 minutos (centrífuga Eppendorf 5804R), sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 150µL de etanol 70% a temperatura ambiente e foi realizada nova centrifugação a 4.000rpm por 15 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a placa invertida, envolta em papel toalha, a 300rpm durante 5 segundos. Logo após, incubou-se a placa por 15 minutos a 37°C envolta em papel absorvente, para permitir a evaporação do etanol.

Com a secagem do conteúdo, o DNA foi ressuspensão em 8µL de *loading buffer* (70% de formamida, 1M de EDTA). A placa foi fechada e homogeneizada, por aproximadamente 2 minutos em *vortex*, dado um *spin* e as amostras purificadas foram injetadas no sequenciador *MegaBace 1000*[®] DNA Analysis System (GE Healthcare, Buckinghamshire), a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídas por 150 minutos a 9KV.

4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Após a eletroforese, as sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>), procedimento realizado com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC).

A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Os eletroferogramas foram analisados em nosso laboratório com a colaboração da Dra. Yara Costa Netto Muniz. Para isso, foi utilizado o programa SeqMan do pacote Lasergene. O alinhamento dos gráficos gerados pelo sequenciamento foi feito com a sequência molde de cada éxon obtida no Genebank (http://www-p53.iarc.fr/TP53sequence_NC_000017-9.html). Todo o alinhamento foi confirmado visualmente e as mutações anotadas.

Após a identificação dos pontos de mutação e sua classificação, estas foram comparadas com o banco de dados presentes no site da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - <http://www.iarc.fr/MutationValidationCriteria.asp>).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base em tabelas de contingência 2x2 foi verificada a associação de determinados genótipos e dados clínicos e epidemiológicos com a suscetibilidade ao câncer de mama através do teste *odds ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o limite de significância. A OR foi calculada segundo a fórmula $OR = (ad)/(bc)$ (WOOLF, 1955), sendo a, d, b e c as frequências absolutas obtidas em uma tabelas de contingência 2x2.

A *odds ratio* pode ser compreendida como a razão das probabilidades e é comumente utilizada em estudos epidemiológicos para descrever o dano provável que pode ser causado pela exposição a um fator de risco. Quando o valor da *odds ratio* é maior que 1 e o intervalo de confiança não inclui o número 1, pode-se dizer que esta característica é um fator de risco; quando o valor da *odds ratio* for menor que 1 e o intervalo de confiança não incluir o 1, este pode ser considerado fator de proteção. As amostras foram submetidas ao teste de contingência (2X2) para verificar a homogeneidade dos valores. Para este teste e o cálculo da OR foi utilizado o software EpiMax Table Calculator, disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>, sendo que, quando necessário, os valores foram ajustados de acordo com a correção de *Yates*.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO GRUPO DE PACIENTES E CONTROLE

Os resultados obtidos foram feitos a partir de 63 amostras de pacientes de carcinomas de mama, sangue e tumor, e 67 amostras de controles, embora esse número possa variar para algumas análises como descrito no material e métodos.

A idade do grupo de paciente variou de 24 a 86 anos, com uma média de $54 \pm 15,9$ anos. No grupo controle a idade variou de 26 a 80 anos, com uma média de $53,37 \pm 13,34$ anos. E, em ambos os grupos, houve predominância de pessoas na faixa etária dos 42 a 48 anos, o que corresponde a 25% de ambos grupos.

Em relação à ancestralidade informada os dois grupos apresentaram a maioria das mulheres descendentes de europeus (87% e 82% em paciente e controle, respectivamente).

No momento do diagnóstico a maioria das pacientes apresentava-se na menopausa (55%), o que também foi verificado para o grupo controle (64%).

A maior parte das pacientes (82%) teve menarca em idade igual ou superior a 12 anos e 18% relataram que ficaram menstruadas pela primeira vez antes dos 12 anos, sendo que a idade mínima foi de 9 e a máxima de 17 anos. Para o grupo controle 86% tiveram menarca em idade igual ou superior a 12 anos e 14% relataram que ficaram menstruadas pela primeira vez antes dos 12 anos de idade, sendo a idade mínima 9 e a máxima 19 anos.

Em relação à paridade, a maioria das pacientes e das mulheres pertencentes ao grupo controle eram múltiparas (87% e 89%, respectivamente). No entanto, com relação ao número de filhos, a maior parte das pacientes (58%) conceberam mais de 3 vezes e 42% delas tiveram até 2 filhos. Para o grupo de controle, estes valores são de 39% e 61%, respectivamente. Para ambos os grupos, a maioria das mulheres amamentou seus filhos (81% de pacientes e 83% dos controles).

Com relação ao hábito tabagista, 61% das pacientes declararam nunca terem fumado, enquanto no grupo controle essa porcentagem foi de 78%.

Quando perguntadas sobre o consumo de álcool, 66% das pacientes referiram consumo de álcool eventualmente e 60% do grupo controle responderam nunca ter consumido bebidas alcoólicas.

Entre as pacientes, 16 (27%) apresentavam história familiar de câncer de mama positiva com pelo menos um parente de 1º grau afetado. Entre os controles, esse valor foi de 20%.

Os cálculos de OR para as diferentes características epidemiológicas analisadas estão na TABELA 6. A única associação positiva e significativa com câncer de mama foi em relação ao consumo de álcool (OR=2,842; p=0,010).

TABELA 6: Categorização, frequência e *Odds Ratio* (OR) das características epidemiológicas selecionadas para análise, seguidas dos valores de p e χ^2 . (Grupo de pacientes n=59 e controle n=64).

CARACTERÍSTICAS	CATEGORIAS	FREQUÊNCIA ABSOLUTA		ODDS RATIO (IC 95%)	P	χ^2
		PACIENTES	CONTROLES			
Idade	< 40 anos	9	11	0,867	0,964	0,002
	≥ 40 anos	50	53	(0,299 - 2,498)		
Ancestralidade informada	Europeus	51	52	1,798	0,409	0,682
	Não Europeus	6	11	(0,559 - 5,967)		
Paridade	Sim	51	56	0,797	0,893	0,018
	Não	8	7	(0,238 - 2,642)		
Amamentação	Sim	48	48	0,909	1,000	0,000
	Não	11	10	(0,320 - 2,574)		
Consumo de Álcool	Sim	39	26	2,842	0,010	6,744
	Não	19	36	(1,266 - 6,432)		
Consumo de Tabaco	Sim	23	14	2,282	0,061	3,497
	Não	36	50	(0,966 - 5,436)		
Idade Menarca	< 12 anos	11	9	1,277	0,812	0,057
	≥ 12 anos	47	54	(0,432 - 3,785)		
Idade Menopausa	< 54 anos	28	29	2,897	0,367	0,815
	≥ 54 anos	2	6	(0,464 - 22,834)		
Histórico Familiar de Câncer de Mama	Sim	15	11	1,705	0,333	0,938
	Não	40	50	(0,649 - 4,514)		

Os valores totais podem variar devido a dados não informados durante a entrevista.

5.2 MUTAÇÕES NO GENE *TP53* E O CÂNCER DE MAMA

Quanto à presença de mutação para os éxons 5 a 8 do gene *TP53*, não foram encontradas alterações diferenciais de mobilidade eletroforética no grupo controle, pela técnica de PCR-SSCP. Entre as pacientes foram encontradas um total de 10 alterações somente nas amostras de tumor (17%), entre os 59 casos de câncer de mama sugerindo ocorrência de mutações.

A partir desses resultados, as 10 amostras alteradas foram sequenciadas e sete delas (70%) tiveram mutações confirmadas. Três amostras apresentaram duas mutações diferentes no mesmo éxon. Uma amostra apresentou três mutações diferentes no mesmo éxon e uma amostra apresentou 2 mutações em éxons diferentes. Todas as mutações encontradas estão em heterozigose e correspondem à troca de um nucleotídeo (TABELA 7).

TABELA 7: Presença da mutação nos éxons de 5 a 8 do gene *TP53* em pacientes com câncer de mama. Identificação da amostra, éxon, localização da mutação, códon e aminoácido mutado e o efeito da alteração na função da proteína, baseados nos dados de sequenciamento.

Amostra	Éxon	Nucleotídeo	Códon	Aminoácido	Efeito
TU50	5	12436 A>G	150 ACA>GCA	Thr>Ala	Sentido trocado
		12493 A>G	169 ATG>GTG	Met>Val	
TU56	6	12643 C>T	192 CAG>TAG	Glu>parada	Sem sentido
		12656 G>A	196 CGA>CAA	Arg>Glu	
TU58	5	12491 A>G	168 CAC>CGC	His>Arg	Sentido trocado
	6	12685 T>A	206 TTG>ATG	Leu>Met	Sentido trocado
TU04	7	13397 A>G	254 ATC>GTC	Ile>Val	Sentido trocado
TU77	7	13380 G>A	248 CGG>CAG	Arg>Glu	Sentido trocado
TU65	8	13839 G>C	287 GAG>CAG	Glu>Glu	Sentido trocado
		13853 G>C	291 AAG>AAC	Lys>Asn	
TU61	8	13777 G>C	266 GGA>GCA	Gly>Ala	Sentido trocado
		13781 G>T	267 CGG>CGC	Arg>Arg	
		13875 C>A	299 CTG>ATG	Leu>Met	

Foram identificadas três mutações do tipo sentido trocado no éxon 5, ou seja, com troca de aminoácido na proteína; duas mutações do tipo sentido trocado no éxon 6 e uma sem sentido, isto é, com aparecimento de códon de parada; duas mutações do tipo sentido trocado no éxon 7 e cinco mutações no éxon 8, sendo quatro de sentido trocado e uma silenciosa. Das 13 mutações encontradas nas sete amostras seqüenciadas, foram encontradas seis transversões e sete transições, sendo duas delas em sítio CpG. Os códons alterados estão localizados no domínio central da proteína, região de ligação com o DNA alvo.

As pacientes foram separadas em dois grupos, aquelas que apresentaram e as que não apresentaram a mutação para o *TP53*. Estes resultados foram relacionados com os dados epidemiológicos estudados: idade, ancestralidade informada, história reprodutiva (paridade, amamentação, menarca e menopausa), história familiar de câncer de mama, hábito de fumar e consumo de álcool. Os valores de OR, seguidos dos de p encontram-se na TABELA 8. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a presença da mutação *TP53* e os dados epidemiológicos estudados.

TABELA 8: Categorização, frequência e *Odds Ratio* (OR) das características epidemiológicas selecionadas para análise, seguidas dos valores de p e χ^2 . (Grupo de pacientes $n=59$ com e sem mutação).

CARACTERÍSTICAS	CATEGORIAS	MUTAÇÕES EM TP53		ODDS RATIO (IC 95%)	p
		PRESENTE	AUSENTE		
Idade	< 40 anos	0	9	0,305	0,749
	≥ 40 anos	7	43	(0,001 - 5,079)	
Ancestralidade informada	Europeus	7	44	2,191	1,000
	Não Europeus	0	6	(0,122 - 1302,903)	
Paridade	Não	1	7	1,071	1,000
	Sim	6	45	(0,043 - 12,028)	
Amamentação	Sim	6	42	1,429	1,000
	Não	1	10	(0,137 - 34,483)	
Consumo de Álcool	Sim	6	33	3,273	0,496
	Não	1	18	(0,337 - 79,363)	
Consumo de Tabaco	Sim	4	19	2,316	0,524
	Não	3	33	(0,378 - 14,992)	
Idade Menarca	< 12 anos	2	8	2,100	0,773
	≥ 12 anos	5	42	(0,233 - 16,236)	
Idade Menopausa	< 54 anos	5	21	0,714	1,000
	≥ 54 anos	1	3	(0,044 - 21,786)	
Histórico Familiar de Câncer de Mama	Sim	2	13	1,077	1,000
	Não	5	35	(0,126 - 7,627)	

Os valores totais podem variar devido a dados não informados durante a entrevista.

5.3 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Quanto ao tipo histológico, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais frequente, com 41 casos (65%), seguido do carcinoma lobular infiltrante com 6 casos (9%), carcinoma ductal *in situ* com 2 casos (3%), carcinoma tubular em 2 casos (3%), carcinoma mucinoso com 1 caso (2%) e carcinoma adenóide cístico com 1 caso (2%). Em 10 casos (16%)

o tipo histológico não foi informado (NI) (TABELA 9 e FIGURA 18 A).

Quanto ao grau de anaplasia tumoral segundo a Graduação de Elston & Ellis, foram encontrados 7 tumores (11%) classificados com grau histológico I, 26 (41%) com grau histológico II, 16 tumores (26%) com grau histológico III e 14 (22%) dos tumores não tiveram graduação histológica determinada (ND) (FIGURA 18 B).

Quanto ao tamanho do tumor, 24 pacientes (38%) apresentaram tumores ≤ 2 cm, 24 (38%) apresentaram $2 < T \leq 5$ cm, 4 (6%) apresentaram tumores > 5 cm e 11 pacientes (18%) não tiveram o tamanho do tumor determinado (ND) (FIGURA 18 C).

Quanto ao comprometimento linfonodal, observamos que 30 pacientes (48%) apresentaram pelo menos 01 linfonodo comprometido, 22 pacientes (35%) não apresentaram comprometimento linfonodal e 11 casos (17%) não foram informados (NI) (FIGURA 18 D).

TABELA 9: Distribuição das características clinico-patológicas e relação entre a presença e ausência de mutação em *TP53* em pacientes com câncer de mama.

CARACTERÍSTICAS	CATEGORIAS	Mutação em <i>TP53</i>		ODDS RATIO (IC 95%)	p	2
		PRESENTE	AUSENTE			
Grau de Elston	I e II	0	33	0,024	0,002	10,018
	III	6	10	(0,000 – 0,407)		
Tamanho do tumor	≤ 2 cm	0	24	0,087	0,122	2,383
	> 2 cm	5	23	(0,000 – 1,431)		
Linfonodo comprometido	Sim	4	26	1,538	0,973	0,001
	Não	2	20	(0,208 – 13,659)		
Tipo histológico do carcinoma	Infiltrante	6	41	2,036	1,000	0,000
	Não infiltrante	0	6	(0,110 – 1223,434)		

Os valores totais podem variar devido a dados não informados durante a entrevista.

Quanto à distribuição das características clinico-patológicas e sua relação com a presença e ausência de mutação em *TP53*, encontrou-se associação positiva entre o grau de Elston e a presença de mutação (OR=0,024; p=0,002). Para as outras características clinico-patológicas averiguadas (tamanho do tumor, comprometimento linfonodal e tipo

histológico do carcinoma) não se encontrou associação estatisticamente significativa.

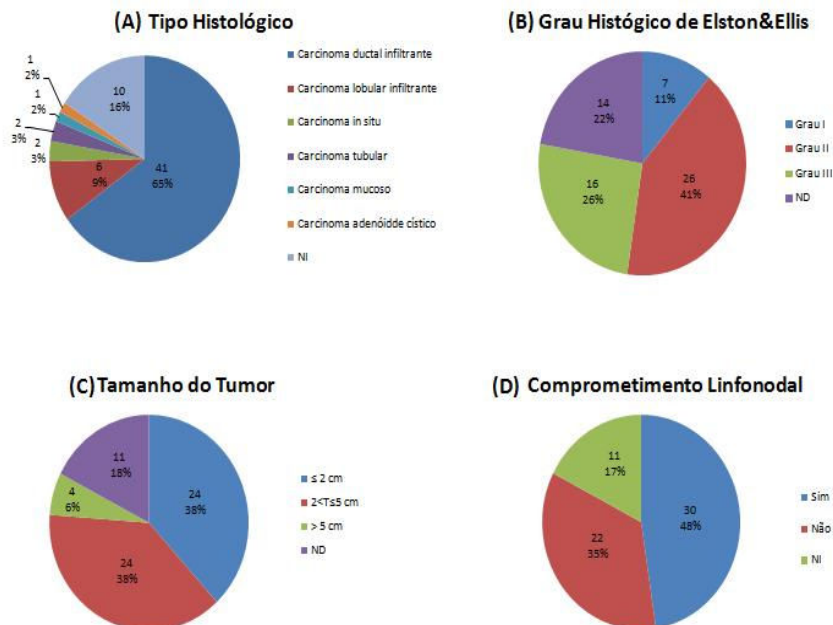


FIGURA 18: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com: (A) tipo histológico; (B) grau de anaplasia do tumor; (C) tamanho tumoral (cm); (D) comprometimento linfonodal. ND: não determinado; NI: não informado.

6. DISCUSSÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 2005), sendo esperados para o ano de 2010 (segundo *American Cancer Society*) mais de 1,5 milhão de novos casos no mundo todo. Além disso, é uma das principais causas de morte global, responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, e a estimativa é de que o câncer continue vitimando e levando a óbito 10,3 milhões de pessoas em 2020 e 12 milhões em 2030 (GUERRA *et al.*, 2005; WHO, 2011).

O câncer de mama, na atualidade, é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2010), sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. É uma doença cuja etiologia e prognóstico são muito variados e as interações entre fatores genéticos e ambientais parecem exercer um peso importante tanto em relação ao risco como na evolução dos casos (MOURA-GALLO *et al.*, 2004).

6.1 PROBLEMAS RELACIONADOS À PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SSCP

A partir do protocolo descrito por SIMÃO *et al.*, 2002, alguns ajustes foram necessários, para que a técnica correspondesse às expectativas. Estes ajustes demandaram tempo e esforço.

Distintas concentrações de gel de poliacrilamida (não-desnaturante) foram testadas para os diferentes éxons, 8%, 10% e 14% de modo que se obteve um resultado satisfatório a 10% para os éxons 5, 7 e 8 e para o éxon 6 a melhor resolução obtida para leitura e interpretação dos resultados foi gel de poliacrilamida 14% buscando uma boa diferenciação do perfil eletroforético do controle positivo.

Os mesmos testes ocorreram para definição do tempo de eletroforese sendo testados diferentes tempos entre 10 a 20h, procurando manter o valor de 3,7 V/cm (comunicação pessoal LOIOLA, 2008). Todos os testes foram feitos em temperatura ambiente constante de 20°C.

Após este período de padronização, procederam-se as análises.

6.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO GRUPO DE PACIENTES

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, a maioria das pacientes afetadas por essa neoplasia encontra-se na faixa etária de 40 a 69 anos, com predominância do câncer de mama considerado esporádico, ou seja, sem associação com o fator hereditário, representando mais de 90% dos casos de câncer de mama em todo mundo, enquanto que apesar de ser considerada um fator de risco para a doença, a história familiar representa 5 a 10% dos casos estando normalmente associado a mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* (TIEZZI, 2009; PHAROAH *et al.*, 2007; DUFLOTH *et al.*, 2005).

Na nossa amostra, a maior parte das pacientes (86%) apresentou idade maior ou igual a 40 anos no momento do diagnóstico da doença encontrando-se portanto, dentro da idade esperada da confirmação do diagnóstico.

Estudos realizados por OLIVEIRA *et al.* (2009), em uma amostra de pacientes do estado do Paraná, encontraram média etária de $57,7 \pm 13,7$ anos. Tais valores são próximos dos encontrados no presente trabalho ($53,37 \pm 13,34$ anos).

Populações euro e afro-descendentes são consideradas de alto risco para o câncer de mama em relação à incidência de mutações no gene *TP53* (HILL & SOMMER, 2002). Entretanto, no presente estudo não foi encontrada associação significativa entre a presença de mutação em *TP53* e a ancestralidade informada, o que em parte poderia ser explicado pelo baixo número de indivíduos não-europeus na composição da amostra.

Menarca precoce, menopausa tardia são conhecidamente considerados fatores de risco para o câncer de mama sugerindo uma forte influência dos hormônios, especialmente os estrógenos, no desenvolvimento dessa neoplasia (PRUTHI *et al.*, 2007). O maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, não só por ser um ativador da proliferação das células do tecido mamário, mas também por admitir-se que possui um efeito anti-apoptótico, impedindo a morte programada das células com danos no DNA e consequentemente com alterações em genes que controlam o ciclo celular (NAROD & FOULKES, 2004). No presente estudo não houve associação estatisticamente significativa destas características quando foram comparados pacientes e controles, ou mesmo presença/ ausência de mutação entre pacientes. Resultados

similares de ausência desta associação foram verificados por SIMÃO *et al.* (2002).

A glândula mamária é a fonte mais frequente de tumores e segundo RUSSO & RUSSO (1996) o risco de câncer de mama aumenta em mulheres nulíparas e com idade avançada devido à baixa diferenciação das estruturas na glândula mamária que retém uma grande quantidade de células epiteliais indiferenciadas, as células-tronco, susceptíveis à transformação neoplásica.

Em relação à paridade e a amamentação, o presente trabalho (TABELA 8) não encontrou associação ao comparar pacientes e controles, tampouco com a presença de mutação em *TP53*. Resultados similares foram encontrados por MOURA-GALLO *et al.* (2004); SIMÃO *et al.* (2002) em estudo com pacientes do Rio de Janeiro (RJ).

Dados da literatura indicam que a associação do tabagismo com o câncer de mama é bastante controversa. Em relação à presença de mutações no gene *TP53* e câncer de mama, o estudo epidemiológico publicado por CONWAY *et al.* (2002) com uma população afro-descendente da Carolina do Norte (Estados Unidos) revelaram associação positiva entre o câncer de mama e presença de mutações no gene *TP53*. Por outro lado, resultados obtidos por SIMÃO *et al.* (2002); MOURA-GALLO *et al.* (2004) para populações brasileiras (Rio de Janeiro e São Paulo), não evidenciaram associações estatisticamente significativas. No presente estudo, tal associação tampouco foi significativa.

Outro fator de risco analisado foi o consumo de álcool. Há evidências de que o consumo de álcool contribui para o desenvolvimento do câncer de mama. FREUDENHEIM *et al.* (2004) em estudo com mulheres caucasianas novaiorquinas, encontraram associação entre o consumo de álcool e o aumento da probabilidade de mutações em *TP53* em mulheres portadoras de carcinomas mamários na pré-menopausa. Entretanto, estudando a população brasileira, SIMÃO *et al.* (2002), MOURA-GALLO *et al.* (2004), relatam em seus trabalhos ausência de associação entre esse fator de risco e a ocorrência de mutações no *TP53*. Embora o presente estudo não tenha indicado, estatisticamente, uma associação positiva entre o consumo de álcool e a presença de mutações no gene *TP53* no câncer de mama, a comparação entre pacientes e controles mostrou associação ($p=0,010$).

Diversos estudos epidemiológicos têm identificado grupos de mulheres com histórico familiar de câncer que possuem um risco elevado de desenvolver câncer de mama. Mulheres com pelo menos um parente de 1º grau afetado têm um risco relativo de 2,3 enquanto

naqueles com mãe e irmã afetada o risco de desenvolver a doença eleva-se de duas a seis vezes (risco relativo 14) (BERNSTEIN *et al.*, 1999). SIMÃO *et al.* (2002) mostraram que a associação entre história familiar (1º grau) de câncer de mama e alteração em *TP53* não foi estatisticamente significativa, mas mostraram uma tendência (OR=1,8; IC95% 0,92-25,13). O presente estudo não identificou tal associação, corroborando dados previamente publicados por MOURA-GALLO *et al.* (2004).

6.3 MUTAÇÕES NO GENE *TP53* E O CÂNCER DE MAMA

A região Sul do Brasil concentra o maior número de casos de câncer de mama; em Santa Catarina, onde a incidência da doença é alta, há poucos estudos publicados envolvendo a genética do câncer de mama (SEREIA, 2009). Além disso, dados clínicos, epidemiológicos e experimentais demonstram que o risco de desenvolvimento de câncer de mama (esporádico) está fortemente relacionado a fatores não-genéticos bem como fatores genéticos que desempenham um papel crucial para o surgimento da doença.

Dentre estes, destaca-se o papel do gene *TP53*. Este gene desempenha um papel central na regulação do crescimento e sobrevivência celular e é um dos genes mais frequentemente mutados nos cânceres humanos, enfatizando que o mesmo é essencial para a prevenção do câncer (JOERGER & FERSHT, 2008; McKINNEY & PRIVES, 2007). No câncer de mama, a frequência de mutações no gene *TP53* é de 30%, sendo a alteração mais encontrada (ROSSNER *et al.*, 2009; BORRENSSEN-DALE, 2003).

Neste trabalho, das 59 amostras de tumores analisadas 12% apresentaram mutação neste gene quando considerada a técnica de sequenciamento. Este número pode ser maior que o descrito, uma vez que neste trabalho analisamos somente 4 éxons, sendo que o gene apresenta um total de 11 éxons (FREBOURG & FRIEND, 1992) e 10 íntrons (BAI & ZHU, 2006).

Todos os éxons analisados apresentaram pelo menos uma amostra com alteração no perfil eletroforético, e sequenciamento. Os dados da bibliografia relatam que a maioria das alterações encontradas no gene *TP53* está localizada nos éxons 5 a 8, onde há regiões de *hotspots* de mutações tais como códons 175 (éxon 5) e 273 (éxon 8) (JOERGER & FERSHT, 2008). Não foram encontradas mutações nestes códons nem em códons flanqueadores. Talvez isso possa ser explicado pelo baixo número de amostras mutadas e sequenciadas. Outra hipótese que pode

ser levantada, para futura investigação, é que diferentes populações podem apresentar diferentes frequências entre as diversas mutações, conforme evidenciado por NAGAI *et al.* (2003) em um estudo de duas regiões geográficas (São Paulo e Salvador) da população brasileira. Os autores classificam a população de São Paulo como “brancos” e a de Salvador como “afro-brasileiros” e relatam uma alta frequência de mutações em *TP53* em “negros” (32,7%) quando comparados aos “brancos” (13,6%), sendo esta diferença significativa ($p=0,001$).

A partir da análise das sete amostras mutadas confirmadas por sequenciamento, foram encontradas treze mutações no gene *TP53* (TABELA 7).

As mutações ocorreram na região da ligação ao DNA (éxons 5 a 8), o que pode ter ocasionando a perda da capacidade da p53 de transativação de genes-alvo.

6.4 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Foi avaliada a possível relação entre a presença de mutações em *TP53* e a associação entre estas alterações e as características do tumor de importância para o prognóstico da paciente. A identificação de fatores prognósticos é necessária para definir com precisão quais mulheres vão se beneficiar do tratamento (BUNDRED, 2001).

Dentre estas características estão o tipo histológico, o grau histológico do tumor, tamanho do tumor e a presença de metástase em linfonodos regionais.

Cerca de 70% dos carcinomas de mama diagnosticados são do tipo ductal infiltrante (WHO, 2003). Dados da literatura indicam, ainda, que os tumores lobulares invasivos (CLI) apresentam melhor prognóstico do que os carcinomas ductais invasivos (CDI) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os tipos que apresentam melhor prognóstico são: medular, colóide, tubular, papilar, Paget e adenocístico. O carcinoma inflamatório é o de pior prognóstico (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003; FEBRASGO, 2001). Das pacientes analisadas, 79% (42/53) apresentaram carcinoma ductal infiltrante; 13,5% (7/53) carcinoma lobular infiltrante; e em 7,5% (4/53) observou-se tipos histológicos raros. Esses resultados estão de acordo com as frequências descritas na literatura para os diferentes tipos histológicos de tumores mamários: cerca de 80% para os tumores do tipo ductal; 10% a 15% para os tumores lobulares; e menos de 10% para os subtipos raros. Ao categorizar os tipos histológicos de carcinoma em infiltrantes e não

infiltrantes relacionados à presença de mutação no gene *TP53*, não foi obtida associação significativa (OR=2,036; p=1,000).

Os linfonodos axilares são os primeiros sítios de metástases no carcinoma mamário e indicam uma probabilidade maior de desenvolvimento de metástases à distância (CLARKE & FULLER, 2006) sendo que os sítios mais frequentemente acometidos nesses casos (85%) são os tecidos ósseo, pulmonar e hepático (BEREK & NOVAK, 2008). Pacientes sem comprometimento metastático para linfonodos axilares apresentam um melhor prognóstico, tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença (ABREU & KOIFMAN, 2002). Na presente amostra, 58% (30/52) das pacientes apresentaram metástases em linfonodos, indicando um prognóstico desfavorável, uma vez que metástases sistêmicas podem apresentar consequências potencialmente fatais (BEREK & NOVAK, 2008). Da mesma forma que SIMÃO *et al.* (2002), no presente estudo não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a presença de mutações no gene *TP53* e o comprometimento dos linfonodos (OR=1,538; p=0,973).

O tamanho do tumor é um importante indicador prognóstico no carcinoma mamário. A sobrevida das pacientes encontra-se na relação inversa ao diâmetro do tumor (FEBRASGO, 2001). Os tumores de menor tamanho estão invariavelmente relacionados a um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença (ABREU & KOIFMAN, 2002). CHIA *et al.* (2004) mostraram que pacientes com tumores de 2-5cm apresentam taxa de sobrevida menor (66%) do que pacientes com tumores menores que 1cm (79%), e que tumores de maior tamanho estão, em geral, relacionados com a presença de metástases em linfonodos regionais. Assim, quanto maiores os tumores maiores são as possibilidades de metástase em axilas. Tumores com 3 ou 4cm apresentam 50% de chances de metástases axilares (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003).

Neste estudo, 8% das pacientes apresentaram tumores maiores que 5cm. Também foi possível observar que 50% (2/4) das pacientes que possuíam tumores maiores que 5cm apresentaram metástases em linfonodos, enquanto que 46% (11/24) das pacientes com tumores menores que ≤ 2 cm apresentaram metástase. Ao relacionar o tamanho do tumor com a presença de mutação em *TP53* não houve associação significativa (OR=0,087; p=0,122).

O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização (ABREU & KOIFMAN, 2002). Os tumores classificam-se em: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco

diferenciado) Quanto maior o grau histológico, pior será o prognóstico do tumor (GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA, 2003). A sobrevida e o intervalo livre da doença são maiores nos tumores diferenciados que, em geral, apresentam maior índice de positividade de receptores de estradiol (FEBRASGO, 2001).

No presente estudo, 14% (7/49) das pacientes foram diagnosticadas com tumor de grau I, enquanto 86% (42/49) delas apresentavam graus mais avançados (II ou III) ao diagnóstico. Tumores com graus histológicos mais avançados também apresentaram-se relacionados com a presença de metástases em linfonodos regionais: 75% (12/16) das pacientes com tumor de grau III apresentaram metástase, enquanto 71% (5/7) das pacientes com tumor de grau I apresentaram metástase em linfonodos.

Ao relacionar a presença de mutação em *TP53* com o grau histológico que reflete a malignidade do tumor (Grau de Elston), a associação foi positiva (OR=0,024; p=0,002). Valores de associação positiva foram previamente descritos por SIMÃO *et al.* (2002), corroborando a hipótese de que a agressividade do tumor está associada à presença de mutações no gene *TP53*.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho procurou trazer uma contribuição na etiologia da doença, no que diz respeito à presença de mutações do gene *TP53* (éxons 5, 6, 7 e 8) e os possíveis efeitos de características epidemiológicas e clínico-patológicas do tumor, no surgimento e desenvolvimento do câncer de mama, tendo-se observado que:

✓ Em relação ao consumo de álcool, os dois grupos de estudo (pacientes e controle) mostraram-se estatisticamente distintos ($p=0,010$), com prevalência do consumo pelas pacientes.

✓ Não se evidenciaram diferenças estatisticamente significativas em relação às características epidemiológicas selecionadas para análise entre o grupo de pacientes e controle, embora em relação ao hábito tabagista o valor de p está próximo da significância ($p=0,061$). Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à presença de mutações no gene *TP53* no câncer de mama e às características epidemiológicas selecionadas para análise.

✓ Quanto à presença de mutação para os éxons 5 a 8 do gene *TP53*, não foram encontradas alterações eletroforéticas no grupo controle, pela técnica de PCR-SSCP. Entre as pacientes foram detectadas a presença de bandas de corrida eletroforética diferenciada em 10 amostras (17%) dos tumores, sugerindo ocorrência de mutações em indivíduos heterozigotos, e nenhuma em células sanguíneas.

✓ Todas as sugestões de mutações encontradas pela técnica de PCR-SSCP foram sequenciadas, sendo que destas sete amostras (70%) foram confirmadas, onde foram identificadas 13 mutações.

✓ Em relação às características clínico-patológicas do tumor, foi observada uma associação positiva entre o grau histológico e a presença de mutação em *TP53*, sendo que as mutações encontradas estavam associadas a um estágio mais agressivo de câncer, representado pelo grau III de Elston&Ellis ($OR=0,024$; $p=0,002$).

Análises subseqüentes com um número amostral maior podem auxiliar na confirmação dos achados do presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48(1), p.113-131, 2002.

ABREU, D.C.B. **Imunodeteção da proteína p53 em câncer de mama. um importante fator prognóstico?** Goiânia, Universidade Católica de Goiás. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Genética, 2008.

ACS – *American Cancer Society*. **Breast Cancer Facts & Figure 209-210**. Atlanta: American Cancer Society Inc. 2010.

ADAMI H.O.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. **Textbook of Cancer Epidemiology**. 2ed. Oxford: Oxford University Press. 2008.

AJCC Cancer Staging Manual. 6ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia PA, 2002. Disponível em: <http://books.google.com/books>. Acessado em Janeiro de 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v.25, 3389-3402, 1997.

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

BAI, L.; ZHU, W.G. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. **Journal of Cancer Molecules**, v.2(4), p.141-153, 2006.

BELYI, V.A.; LEVINE, A.J. One billion years of p53/p63/p73 evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106(42), p.17609-17610, 2009.

BENZ, C. C. Impact of aging on the biology of breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.66(1), p.65-74, 2008.

BEREK & NOVAK, TRATADO DE GINECOLOGIA. 14ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2008.

BERGMANN, A. **Prevalência de linfedema subsequente a tratamento cirúrgico para câncer de mama no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. Dissertação de Mestrado, 2000.

BERNSTEIN, J.L.; CARRILLO, L.L.; WANG, L. The epidemiology of HER-2/NEU and p53 in breast cancer. **Salud Publica de México**, v.41(2), p.114-123, 1999.

BERTHEAU, P.; ESPIÉ, M.; TURPIN, E.; LEHMANN, J.; PLASSA, L.F; VARNA, M.; JANIN, A.; THÉ, H. TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. **Pathobiology**, v.75, p.132-139, 2008.

BETTS, K. S. Second suspicions – breast cancer and passive smoking. **Environmental Health Perspectives**, v.115(3), p.137-143, 2007.

BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia**/[editor] FILHO, G.B. 7ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.637-638, 2006.

BOND, G.L.; HU, W.; BOND, E.E.; ROBINS, H.; LUTZKER, S.G.; ARVA, N.C.; BARGONETTI, J.; BARTEL, F.; TAUBERT, H.; WUERL, P.; ONEL, K.; YIP, L.; HWANG, S.J.; STRONG, L.C.; LOZANO, G.; LEVINE, A.J. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. **Cell**, v.119, p.591-602, 2004.
BORRESEN-DALE, A.L. TP53 and Breast Cancer. **Human Mutation**, v.21, p.292-300, 2003.

BOUCHET, B.P.; FROMENTEL, C.C.; PUISIEUX, A.; GALMARINI, C.M. p53 as a target for anti-cancer drug development. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.58, p.190-207, 2006.

BOURDON, J.C; FERNANDES, K.; ZMIJEWSKI, F.M.; LIU, G.; DIOT, A.; XIRODIMAS, D.P.; SAVILLE, M.K.; LANE, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes & Development**, v.19, p.2122-2137, 2007.

BOURDON, J.C. p53 and its isoforms in cancer. **British Journal of Cancer**, v.97, p.277-282, 2007.

BOURDON, J.C.; FERNANDES,, K.; MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LIU, G.; DIOT, A.; XIRODIMAS, D.P.; SAVILLE, M.K.; LANE, D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes & Development**, v.19, p.2122-2137, 2005.

BRAITHWAITE, A.W.; PRIVES, C.L. p53: more research and more questions. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p.877-880, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BROSH, R.; ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. **Nature Reviews**, v.9, p.701-713, 2009.

BUNDRED, N.J. Prognostic and predictive factors in breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v.27, p.137-142, 2001.

CADWELL, C.; ZAMBETTI, G.P. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene**, v.277, p.15-30, 2001.

CAVENEY, W.K.; WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. **Scientific American**, v.272, p.72-79, 1996.

CÉBRIAN, E.A. Población de riesgo y beneficio de las manobras preventivas? Qué sabemos hoy? **Boletín Del GEICAM** (Grupo Español de investigación em Cáncer de Mama), v.15, p.41-43, 2005.

CHIA, S.K.; SPEERS C.H.; BRYCE, C.J.; HAYES, M.M.; OLIVOTTO, I.A. Ten year outcomes um a population-based cohort of node-negative, lymphatic and vascular invasion-negative early breast

cancer without adjuvant systemic therapies. **Journal of Clinical Oncology**, v.22, p.1630-13637, 2004.

CLARKE, M.F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of Eve. **Cells**, v.124, p. 1111-1115, 2006.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalyses of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. **Lancet**, v.360, p.187-195, 2002.

COLDITZ, G.A. Epidemiology of Breast Cancer: findings from the nurses' health study. **Cancer Supplement**, v.15, p.1480-1489, 1993.

CONWAY, K.; EDMISTON, S.N.; CUI, L.; DROUIN, S.S.; GERADTS, J.; DRESSLER, L.; LIU, E.T.; MILLIKAN, R.; NEWMAN, B. Prevalence and spectrum of p53 mutations associated with smoking in breast cancer. **Cancer Research**, v.62, p.1987-1995, 2002.

CORN, P.G.; KUERBITZ, S.J.; NOESEL, M.V.; ESTELLER, M.; COMPITELLO, N.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. Transcriptional Silencing of the p73 Gene in Acute Associated with 5' CpG Island Methylation Lymphoblastic Leukemia and Burkitt's Lymphoma Is associated with 5' CpG Island Methylation. **Cancer Research**, v.59, p.3352-3356, 1999.

COSTA, S.; PINTO, D.; PEREIRA, D.; RODRIGUES, H.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.; MEDEIROS, R.; SCHMITT, F. Importance of TP52 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. **BMC Cancer**, v.8, p.1-7, 2008.

CUI, Y.; MILLER, A.B.; ROHAN, T.E. Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. **Breast Cancer Research Treatment**, v.100, p.293-299, 2006.

DANTAS, E.L.R.; SÁ, F.H.L.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E.M.; RIBEIRO, E.M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55(3), p.263-269, 2009.

DeYOUNG, M.P.; ELLISEN, L.W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene**, v.26, p.5169-5183, 2007.

DUFLOTH, R.M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.K.; SHINZATO, J.Y.; SANTOS, C.C.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, v.123, p.192-197, 2005.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? **Journal of Cell Medicine**, v.9, p.208-221, 2005.

DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; PHAROAH, P.D.P.; TEARE, M.D.; PONDER, B.A.J.; EASTON, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.8, p.843-854, 1999.

EFEYAN, A.; SERRANO, M. p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. **Cell Cycle**, v.6, p.1006-1010, 2007.

ELSTON, W.C.; ELLIS, I.O. 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**, v.19, p.403-410, 1991.

FARIAS, R.E.; SOUZA, A.R.; AARESTRUP, F.M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Carcinologia**, v.51, p.209-218, 2005.

FARNEBO M.; VLADIMIR, J.N.; WIMAN, G. The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.396, p.85-89, 2010.

FEBRASGO, TRATADO DE GINECOLOGIA. Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2001.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **ONCOLOGIA MOLECULAR**, Ed Atheneu, 2004.

FREBOURG, T.; FRIEND, S.H. Cancer Risks from Germline P53 Mutations. **Journal of clinical Investigation**, v.90, p.1637-1641, 1992.

FREUDENHEIM, J.L.; BONNER, M.; KRISHNAN, S.; AMBROSONE, C.B.; GRAHAM, S.; McCANN, S.E.; MOYSICH, K.B.; BOWMANN, E.; NEMOTO, T.; SHIELDS, P.G. Diet and alcohol consumption in relation to p53 mutations in breast tumors. **Carcinogenesis**, v.25, p.931-939, 2004.

GINECOLOGIA & OBSTETRÍCIA. Manual para concursos. 3ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2003.

GHAFOOR, A.; JEMAL, A.; WARD, E. Trends in breast cancer by race and ethnicity. **CA Cancer Journal Clinic**, v.53, p.342-355, 2003.

GASCO, M.; SHAMI, S.; CROOK, T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.4(2), p.70-76, 2002.

GUERRA, M.R.G; MOURA-GALLO, C.V.; AZEVEDO, A.S.M. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51(3), p.227-234, 2005.

GUIMARAES, D.P.; HAINAUT, P. TP53: a Key gene in human cancer. **Biochimie**, v. 84, p.83-93, 2002.

HALLAL, A.L.C.; GOTLIEB, S.L.D.; LATORRE, M.R.D.O. Evolução da mortalidade por neoplasias malignas no Rio Grande do Sul, 1979-1995. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.4, p.168-177, 2001.

HANKER, L.; KARN, T.; RUCKHAEBERLE, E.; GAETJE, R.; SOLBACH, C.; SCHMIDT, M.; ENGELS, K.; HOLTRICH, U.; KAUFMANN, M.; RODY, A. Clinical relevance of the putative stem cell marker p63 in breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.122, p.765-775, 2010.

HILL, K.A.; SOMMER, S.S. p53 as a mutagen test in breast cancer. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v39, p.216-227, 2002.

HRSTKA, R.; COATES, P.J.; VOJTESEK, B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v13, p.440-453, 2009.

HULKA, B.S.; MOORMAN, P.G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v.38, p.103-116, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Estimativa 2008 – incidência de câncer no Brasil. Brasil, 2008. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ma ma>. Acessado em janeiro de 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Worldcancer report. STWART, B.W.; KLEIHUES E. IARC Press. Lyon, 2010.

JOERGER, A.C.; FERSHT, A.R. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.77, p.557-582, 2008.

JUNTILA, M.R.; EVAN, G.I. p53 - a Jack of all trades but master of none. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.821-829, 2009.

KESHAVA, C.; FRYE, B.L.; WOLFF, M.S.; McCANLIES, E.C.; WESTON, A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.11, p.127-130, 2002.

KLIJN, J.G.M.; BERNS, E.M.J.J.; FOEKENS, J.A. **Prognostic and predictive factors and targets for therapy in breast cancer**. “In”: Pasqualini JR, editor. Breast cancer. Prognosis, Treatment and Prevention. New York: Marcel Dekker Inc; 2002.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A.; PALLADINO, M. A. **Conceitos de Genética**. 9ed, Porto Alegre, Artmed, 896p, 2010.

KUSCHEL, B.; AURANEN, A.; MCBRIDE, S.; NOVIK, K.L.; ANTONIOU, A.; LIPS-COMBE, J.M.; DAY, N.E.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.; PHAROAH, P.D.; DUN-NING, A. Variants in DNA

double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v.11, p.1399-407, 2002.

KYLE, T.B. **Prognostic and predictive factors in breast cancer.** College of American Pathologists Consensus Statement, 2007.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, v.13, p.293-325, 2006.

LAI, H.; FANGCHAO, M.; TRAPIDO, E.; MENG, L.; LAI, S. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.83, p.57-66, 2004.

LANGSENLEHNER, U.; KRIPPL, P.; RENNER, W.; YAZDANI-BIUKI, B.; WOLF, G.; WASCHER, T.C.; PAULWEBER, B.; WEITZER, W.; SAMONIGG, H. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.81, p.169-172, 2003.

LATONEN, L.; LAIHO, M. Cellular UV damage responses-Functions of tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer**, v.1755(2), p.71-89, 2005.

LENOIR, G.M.; LYNCH, H.; WATSON, P.; CONWAY, T.; LYNCH, J.; NAROD, S.; FEUNTEUN, J. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet**, v.338, p.82-83, 1991.

LEVINE, A.J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.749-758, 2009.

LEVY, C.B. **Análise de mutações no gene TP53 em casos de câncer de mama e estudo da proteína p53 mutante: aspectos fisiopatológicos do tumor.** Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, 2010.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocrinal Reviews**, v.21, p.40-54, 2000.

- LIEHR, J. G.; ROY, D. Hormone-associated Cancer: Mechanistic Similarities between Human Breast Cancer and Estrogen-induced Kidney Carcinogenesis in Hamsters. **Environmental Health Perspectives**, v.105, n.3, 1990.
- LUKASHCHUK, N.; VOUSDEN, K.H. Ubiquitination and degradation of mutant p53. **Molecular Cell Biology**, v.27, p.8284-8295, 2007.
- MARCEL, V.; HAINAUT, P. p53 isoforms – A conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? **Cellular Molecular Life Sciences**, v.66, p.391-406, 2009.
- MARTIN, A. C. R.; FACCHIANO, A. M.; CUFF, A. L.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P.; THORNTON, J. M. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. **Human Mutation**, v.19, n.2, p.149-164, 2001.
- MARTIN, A.M.; WEBER, B.L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. **J Natl Cancer Int.**, v.92, p.1126-35, 2000.
- McKINNEY, K.; PRIVES, C. **Regulation of p53 dna binding**. 25 Years of p53 Research, p.27-51, 2007.
- McPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M. Breast Cancer – epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v.321, p.624-628, 2000.
- MENKO, F.H.; LIGTENBERG, M.J.; BROUWER, T.; HAHN, D.E.; AUSEMS, M.G. DNA-based diagnosis of hereditary tumor predisposition. **Ned Tijdschr Geneesk**, v.151, n.5, p.295-298, 2007.
- MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P.A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L.M.; DING, W.; BELL, R.; RO-SENTHAL, J.; HUSSEY, C.; TRAN, T.; MCCLURE, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; PHELPS, R.; HAUGEN-STRANO, A.; KATCHER, A.; YAKUMO, K.; GHOLAMI, Z.; NASS, S.J.; HERMAN, J.G.; GABRIELSON, E. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increase with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 4346-4348, 2000.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.
Robbins & Cotran – Fundamentos de patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2006.

MOURA-GALLO, C.V.; MENDONÇA, G.A.S.; MORAES, E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. **Mutation Research**, v.589, p.192-207, 2005.

MOURA-GALLO, C.V.; SIMÃO, T.A.; RIBEIRO, F.S.; ANDRADA-SERPA, M.J.; CARDOSO, L.E.B.; MENDONÇA, G.A. Mutações do gene p53 em tumores malignos de mama: associação com os fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7(2), p.167-75, 2004.

MORCH, L.S.; JOHANSEN, D.; THYGESEN, L.C.; TJONNELAND, A.; LOKKEGAARD, E; STAHLBERG, C. GRONBAEK, M. Alcohol drinking, consumption patterns and breast cancer among Danish nurses: a cohort study. **The European Journal of Public Health**, p.1-6, 2007.

NAGAI, M.A. Alterações genéticas em câncer de mama. **Revista Brasileira de Mastologia**, v.5(3), p.31-41, 1995.

NAGAI, M.A.; BARBOSA, H.S.; ZAGO, M.A.; SILVA Jr, W.A.; NISHIMOTO, I.N.; SALAORNI, S.; COSTA, L.N.F.G.; ARAUJO, M.S.; OLIVEIRA, A.G.C.; NETO, M.M.; BRENTANI, M.M. TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. **International Journal of Oncology**, v.23, p.189-196, 2003.

OKAZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. **Japanese Cancer Association**, v 96, p.729-737, 2005.

OKOROKOV, A.L.; ORLOVA, E.V. Structural biology of the p53 tumor suppressor. **Current Opinion in Structural Biology**, v.19, p.197-202, 2009.

OKOROKOV, A.L.; SHERMAN, M.B.; PLISSON, C.; GRINKEVICH, V.; SIGMUNDSSON, K.; SELIVANOVA, G.; MILNER, J.; ORLOVA,

E.V. The structure of p53 tumor suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. **The EMBO Journal**, v.25, p.5191-5200, 2006.

OLIVEIRA, M.M.C.; TORRESAN, C.; OLIVEIRA, S.F.V.; TORREZAN, G.T.; ABUAZAR, C.S.; LIMA, R.S.; URBAN, C.A.; CAVALLI, L.R.; RIBEIR, E.M.S.F.; CAVALLI, I.J. Epidemiologia do câncer de mama em pacientes do sul do Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, p.4-14, 2009.

OLIVIER, M.; LANGEROD, A.; CARRIERI, P.; BERGH, J.; KLAAR, S.; EYFJORD, J.; THEILLET, C.; RODRIGUEZ, C.; LIDEREAU, R.; BIE'CHE, I; VARLEY, J.; BIGNON, Y.; UHRHAMMER, N.; WINQVIST, N.; JUKKOLA-VUORINEN, N.; NIEDERACHER, D.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; HAINAUT, P.; BORRESEN-DALE, A. The Clinical Value of Somatic TP53 Gene Mutations in 1,794 Patients with Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v.12 p.1157-1167, 2006.

OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations patterns in breast cancer: searching for clues of environmental carcinogenesis. **Semin Cancer Biol.**, v.11, p.353-60, 2001.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical use. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, v.2, p.1-17, 2010.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, p.874-9, 1989.

PARKIN D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v.55, n.2, p.74-108, 2005.

PARMIGIANI, R.B.; CAMARGO, A.A. **O genoma Humano e o Câncer**. IN: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. (Org.). *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S.V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor

phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human mutation**, v.28, n.6, p.622-629, 2007.

PFEIFER, G.P. P53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. **Mutational Research**, v.450, p.155-166, 2000.

PHAROAH, P.D.; DAY, N.E.; DUFFTY, S.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.J. Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v.71, p.800-809, 1997.

PHAROAH, P.D.P.; TYRER, J.; DUNNING, A.M.; EASTON, D.F.; PONDER, B.A.J.; Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. **Public Library of Science Genetics**, v.3, n.3, p.401-406, 2007.

PIETSCH, E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v.25, p.1602-1611, 2006.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**, v.117, p.3155-63, 2007.

PONDER AJ; GAYTHER AS. Mutations of the BRCA1 and BRCA2 Genes and the Possibilities for Predictive Testing. **Mol Med Today**, v.3, p.168-174, 1997.

PRUTHI S.; BRANDT K.R.; DEGNIM A.C.; GOETZ M.P.; PEREZ E.A.; REYNOLDS C.A. A multidisciplinary approach to the management of breast cancer. Part 1: prevention and diagnosis. **Mayo Clinical Proceedings**, v.82, n.8, p.999-1012, 2007.

PUJANA, M.A.; HAN, J.J.; STARITA, L.M.; STEVENS, K.N.; TEWARI, M.; AHN, J.S.; RENNERT, G.; MORENO, V.KIRCHHOFF, T. GOLD, B.; ASSMANN, V.; EL SHAMY, W.M.; RUAL, J.F.; LEVINE, D.; ROZEK, L.S.; GELMAN, R.S.; GUNSALUS, K.C.; GREENBERG, R.A.; SOBHIAN, B.; BERTINI, N.; VENKATESAN, K.; AYIVI-GUEDEHOUSOU, N.; SOLE, X.; HERNANDEZ, P.; LAZARO, C.NATHANSON, K.L.; WEBER, B.L.; CUSICK, M.E.; HILL, D.E.; OFFIT, K.; LIVINSTON, K.L.; GRUBER, S.B.; PARVIN, J.; VIDAL, M. Network modeling links breast cancer susceptibility and

centrosome dysfunction. **Nature genetics**, v. 39, n.11, p.1138-1149, 2007.

REISMAN D, GREENBERG M, ROTTER V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second stronger promoter within intron 1. **Proceeding of Natural Academy of Sciences of USA**, v.85, n.14, p.5147-5150, 1988.

RIBEIRO-SILVA A, ZUCOLOTO S. A família do p53: aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n.2, p.179-184, 2003.

RICCI & GIRIBELA (2004) *apud* RODRIGUES, 2009.
ROBBINS (1996) *apud* ABREU, 2008.

RODRIGUES, M.S. **Análise de Polimorfismos Genéticos de TP53 e XRCC1e sua associação com características de casos de câncer de mama**. Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, 2009.

ROSSNER, P. JR.; GAMMON, M.D.; ZHANG Y.; TERRY, M.B.; HIBSHOOSH, H.; MEMEO L.; MANSUKHANI, M.; LONG, C.; GARBOWSKI, G.; AGRAWAL, M.; KALRA, T.S.; GAUDET, M.M.; TEITELBAUM, S.L.; NEUGUT, A.I. SANTELLA, R.M. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. **Journal of Cellular Molecular Medicine**, v.13, n.9B, p.3847-3857, 2009.

RUSSO, IH, RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environmental Health Perspect**, v. 104, p.938-67, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, v.1, 2001.

SEREIA, A.F.R. **A identificação de polimorfismos em genes de reparo de DNA e de detoxificação como possíveis marcadores de susceptibilidade ao câncer de mama**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Biotecnologia, 2009.

SIMÃO, T.A.; RIBEIRO, F.S.; AMORIM, L.M.F.; ALBANO, R.M.; ANDRADA-SERPA, M.J.; CARDOSO, L.E.B.; MENDONÇA, GULMAR A.S.; MOURA-GALLO, C.V. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil; Association with risk factors and tumor characteristics. **International Journal of Cancer**, v.101, p. 69-73, 2002.

SMEENK L.; van HEERINGEN, S.J.; KOEPEL, M.; VAN DRIEL, M.A.; BARTELS, S.J.J.; AKKERS, R.C.; DENISSOV, S.; STUNNENBERG, H. G.; LOHRUM, M. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 11, p. 3639-3654, 2008.

SOUSSI T. Analysis of p53 gene alterations in cancer: a critical view. Cap. 12, 2007.

SOUSSI T.; Kato, S. Levy, P.P.; Ishioka, C. Reassessment of the TP53 Mutation Database in Human Disease by Data Mining With a Library of TP53 Missense Mutations. **Human Mutation**, v. 25, p. 6-17, 2005.

SOUSSI, T.; WIMAN, K.G. Shaping Genetic alterations in human cancer: The p53 mutation paradigm. **Cancer Cell**, v.12, p.303-312, 2007.

SUTCLIFFE J.E.; BREHM, A. Of flies and men: p53, a tumor suppressor. **FEBS Letters**, v. 567, n. 1, p.86-91, 2004.

SZYMAŃSKA K.; HAINAUT, P. TP53 and mutations in human cancer. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p.231-238, 2003.

TAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. Lyon: **IARC**; 2003.

TIEZZI, D.G. Epidemiologia do câncer de mama. Revista **Brasileira de Ginecologia Obstétrica**, v.31, n.5, p.213-215, 2009.

TOMMISKA, J.; EEROLA, H.; HEINONEN, M. et al. Breast Cancer Patients with p53 pro72 Homozygous genotype have a poorer survival. **Clinical Cancer Research**, v.11, p. 5098-5103, 2005.

TOPHKHANE, C.; YANG, S.; ZHAO, Z. J.; YANG, X. Cell density-dependent regulation of p73 in breast cancer cells. **International Journal Of Oncology**, v.35, p.1429-1434, 2009.

TORRESAN, C. **Estudo dos polimorfismos dos genes GSTM1, GSTT1 e CYP1A1 em cânceres mamários esporádicos**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado do programa de pós-graduação em Genética, 2006.

van OIJEN, M.G.C.T.; SLOOTWEG, P.J. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. **Clinical Cancer Research**, v.6, n.6, p.2138-2145, 2000.

VERONESI, U.; BOYLE, P.; GOLDHISCH, A.; ORECCHIA, R.; VIALE, G. Breast Cancer. **Lancet**, v.365 p.1727-1741, 2005.

VOUSDEN, K.H.; LANE D.P. p53 in health and disease. **Nature Reviews/Molecular Cell Biology**, v.8, p.275-283, 2007.

WEBER, B.L.; NATHASON, K.L. Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 36, p.1193-1999, 2000.

WESTON A.; PAN, C.F.H.; KSIESKI, B.; WALLENSTEIN, S.; BERKOWITZ, G.S.; TARTTER, P.I.; BLEIWEISS, I.J.; BROWER, S.T.; SENIE, R.T.; WOLFF, M.S. p53 haplotype determination in breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v.6, p.105-112, 1997.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood and disease. **Annals of Human Genetics**, v.19, p.251-253, 1955.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v.378, p.789-792, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Classification of tumors, Tumors of breast and Female Genital Organs. 2nd edition. Lyon, France: IARC Press; 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Rev Panam Salud Publica**, v. 12(5), p.366-70, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer Control Programme. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>. Acessado em janeiro de 2011.

ZHOU W.; MUGGERUD, A.A.; PHUONG VUB; DUE, E.U.; SØRLIE, T.; BØRRESEN-DALE, A.; WÄRNBERGA, F.; LANGERØDB, A. Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution. **Molecular Oncology**, v.3, p.214-219, 2009.

ZIMMERMAN, B.T. Understanding breast cancer genetics. University Press of Mississippi, p.3 e 6, 2004. Disponível em: <http://books.google.com/books>. Acessado em Janeiro de 2010.

ANEXOS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama. Para isto pedimos sua colaboração e permissão para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA, será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Iliada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e de tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___ / ___ / _____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis,

Assinatura: _____ RG: _____

QUESTIONÁRIO – Grupo Controle

Data: ___/___/___ Coleta: () sangue

Entrevistador: _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Profissão: _____ Escolaridade: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____

Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____

Naturalidade: _____

Ascendência: _____

Etnia e cor: () Euro-descendente () Afro-descendente

() Asiático-descendente () Indígena-descendente

Observações: _____

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come?

Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come?

Come CARNE regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come?

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente

Quantidade: _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça ()

Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça ()

Outro _____

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não

Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª

Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____

() E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total:

Histórico Médico

Casos de CÂNCER na família? () Sim () Não

Grau _____ de

Parentesco: _____

Tipo: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Casos de Doença Auto-imune na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo: _____

Observações:

QUESTIONÁRIO – Pacientes

Data: __/__/__ Entrevistador: _____
 Coleta: () sangue () tumor Médico responsável: _____

Dados Pessoais:

Nome do Paciente: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____
 Profissão: _____ Escolaridade: _____
 Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____
 Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____
 Naturalidade: _____
 Ascendência: _____
 Etnia e cor: () Euro-descendente () Afro-descendente
 () Asiático-descendente () Indígena-descendente

Observações: _____

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____
 Naturalidade: _____ Ascendência: _____
 Profissão: _____
 Nome da mãe: _____
 Naturalidade: _____ Ascendência: _____
 Profissão: _____
 Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
 Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
 Come CARNE regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
 Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente

Quantidade: _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça ()

Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça ()

Outro _____

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não

Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª

Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____

() E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total:

Histórico Médico

Casos de CÂNCER na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Histórico do CAMA: _____

Observações: _____
