

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

MUTAÇÃO GERMINATIVA *TP53* p.Arg337His E CÂNCER DE MAMA:
ANÁLISE DE PREVALÊNCIA EM UMA SÉRIE DE PACIENTES PROVENIENTES
DE UM HOSPITAL PÚBLICO DO RIO GRANDE DO SUL

Eriza Cristina Hahn

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Patricia Ashton-Prolla
Coorientadora: Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre
Março de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em parceria com o Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do HCPA. O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e por verbas de taxa de bancada das pesquisadoras Patricia Ashton-Prolla e Sandra Leistner-Segal. A execução deste projeto de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, sob o número 04-438.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância”.

Simone de Beauvoir

DEDICATÓRIA

A todas as mulheres que vivenciaram um câncer de mama.

Aos meus amados Robélia, Pedro e Pedro.

AGRADECIMENTOS

Uma das coisas que mais me alegra é demonstrar gratidão. Afinal, nada se constrói sozinho. Como eu acredito ser o resultado das experiências que vivi e das pessoas com quem convivi, gostaria de destacar o meu profundo agradecimento a alguns personagens que, nestes dois últimos anos, tiveram um papel importante na minha constante construção pessoal e profissional.

Primeiro, agradeço as minhas duas orientadoras, Patricia e Sandra, por terem aceitado trilhar este caminho comigo, me guiando da melhor forma. Além disso, por serem exemplos de profissionais fortes e inspiradoras.

Um reconhecimento especial à Sandra, que, para mim, foi luz. Uma luz que me motivou e que despertou em mim a vontade de fazer tudo do melhor jeito possível. Nossa história é anterior ao mestrado e ter convivido com ela foi essencial no processo de recuperação da minha autoestima enquanto cientista, pois fez com que, pela primeira vez, eu me sentisse capaz e importante. Sandra, quero apenas que tu saiba que, ao lembrar de ti, meu coração sorri.

A toda minha família, uma das partes mais bonitas de mim. Em especial aos meus pais, Robélia e Pedro, por se fazerem presentes mesmo estando a mais de 5 mil quilômetros de distância física, pelo apoio incondicional que me dão desde que me trouxeram ao mundo e pelo amor sem restrições que me oferecem todos os dias. Amo muito vocês!

Ao meu parceiro de vida, meu outro Pedro, por dividir comigo os momentos bons, mas, principalmente, por estar comigo nos momentos mais difíceis, sempre disposto a me dar colo e ouvidos e a me incentivar a ser o melhor que posso. Juntos somos mais e vamos além, meu amor.

A minha grande pequena amiga, Marion, que me apresentou a Genética e fez com que eu me apaixonasse por essa área de estudo. Pelas boas risadas, sorvetes, cafés, aprendizados e amor aos cachorros que compartilhamos nesses últimos anos.

A todas as minhas companheiras de laboratório, que juntas formam a família molecular: Ana, Ândria, Diana, Rowena, Lu, Aline, Jéssica, Fran e Rosi. Por terem me ensinado tanto e me dado a oportunidade de ensinar também, além de tornarem meus dias mais agradáveis. Em especial, a minha 'amiga peruana', Diana, e a "minha baby",

Rowena, que excederam os limites do laboratório e se tornaram companheiras de vida. Vocês vão comigo por onde eu for, sempre carregadas no meu coração.

As minhas amigas-irmãs amadas, Isma e Tici, que significam, para mim, que amizade vai além de estar junto a todo momento. Mas que quando se está, nada muda e toda alegria vem à tona e pode ser compartilhada novamente.

A minha família Gaúxi - Mari, João e Lorenza, por acreditarem em mim e me incentivarem a ir cada vez mais longe.

Ao Elmo, secretário do PPGBM, por sempre estar disposto a ajudar e a resolver as questões burocráticas o mais rápido possível.

À professora Andréa Damin, por ter cedido dados clínicos e demográficos de sua amostra coletada no Hospital Fêmina.

À Iva, por confeccionar os mapas de distribuição das pacientes e ter tornado a minha dissertação mais bonita e ilustrada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 CÂNCER	2
1.2 CÂNCER DE MAMA	3
1.3 PROTEÍNA P53 E GENE <i>TP53</i>	9
1.4 MUTAÇÃO <i>TP53</i> P.ARG337HIS	13
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 GERAL.....	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO I	21
5. ARTIGO CIENTÍFICO II	34
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	61
8. PERSPECTIVAS	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
10. ANEXOS	68
- PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRAS	68
- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO	69
- FICHA DE COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	71
11. APÊNDICE	73
- ILUSTRAÇÃO DE METODOLOGIAS E RESULTADOS.....	73
- COMPARAÇÃO DE DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA COLETADAS EM DOIS HOSPITAIS PÚBLICOS DO RIO GRANDE DO SUL	77
- OUTRAS ATIVIDADES	84
- PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ABraOM- Arquivo Brasileiro Online de Mutações	INCA – Instituto Nacional do Câncer
AGVGD – <i>Align</i> – GVDG (software)	Nt – nucleotídeos
Arg – Arginina (aminoácido)	<i>PALB2</i> - <i>Partner and Localizer of BRCA2</i> (gene)
ASO-PCR – <i>Allelic Specific Oligonucleotide</i> (Oligonucleotídeo Alelo-Específico)	PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<i>ATM</i> - <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> (gene)	pH – potencial Hidrogeniônico
<i>BRCA 1, 2</i> – <i>Breast Cancer 1,2</i> (genes)	<i>PTEN</i> - <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> (gene)
CAC – Carcinoma Adrenocortical	R337H – nomenclatura usual de <i>TP53</i> p.Arg337His
<i>CDH1</i> – <i>Cadherin 1</i> (gene)	RE – Receptor de Estrogênio
<i>CHEK2</i> – <i>Checkpoint Kinase 2</i> (gene)	RS – Rio Grande do Sul
CH – Câncer Hereditário	RP – Receptor de Progesterona
CM - Câncer de Mama	SP – São Paulo
CMH – Câncer de Mama Hereditário	SNP – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
DL – Domínio de Ligação	STRs – <i>Short Tandem Repeats</i> (Repetições Curtas em Sequência)
DO – Domínio de Oligomerização	SLF – Síndrome de Li-Fraumeni
ESP – <i>Exome Sequencing Project</i>	LFL – Síndrome de Li-Fraumeni- <i>like</i>
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre	MDM2 – <i>Murine Double Minute 2</i> (proteína)
HER2 – <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)	SUS – Sistema Único de Saúde
His – Histidina (aminoácido)	<i>STK11</i> - <i>Serine/Threonine Kinase 11</i> (gene)
	<i>TP53</i> – <i>Tumor Protein 53</i> (gene)

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1: Estimativas de câncer no mundo, dados de incidência e de mortalidade.

Figura 2: Panorama epidemiológico do câncer de mama em mulheres, dados mundiais e brasileiros.

Figura 3: Distribuição de mutações germinativas associadas à predisposição ao câncer de mama hereditário.

Figura 4: Visão geral de processos envolvidos na supressão tumoral por p53.

Figura 5: Domínios da proteína p53 e mutações germinativas associadas ao câncer em humanos.

Figura 6: Frequência dos diferentes tipos de tumores em 1.509 portadores de mutações germinativas em *TP53*.

Figura 7: Esquematização do efeito da substituição de uma arginina por uma histidina no códon 337 de p53 sobre formação de tetrâmeros funcionais em pH levemente alcalino.

Anexos

Figura 1a: Fluxograma adotado durante a coleta de material biológico de pacientes com câncer de mama e/ou ovário (projeto original).

Apêndices

Figura 1b: Distribuição geográfica do local de nascimento dos pacientes envolvidos no estudo.

Figura 2b: Resultados da genotipagem em uma portadora de *TP53* p.Arg337His.

Figura 3b: Resultado da haplotipagem, baseada na técnica de *Allelic-Specific Oligonucleotide PCR* (ASO-PCR) para genotipagem do SNP179 (rs9894946), um polimorfismo em forte desequilíbrio de ligação com a mutação *TP53* p.Arg337His.

Figura 4b: Metodologia adotada para a extração de DNA proveniente de tumor de mama.

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1: Principais síndromes de predisposição ao câncer hereditário que incluem o câncer de mama em seu espectro fenotípico.

Artigo científico I

Tabela 1: Caracterização demográfica e clínica do grupo “não selecionado”.

Artigo científico II

Tabela 1: Resumo descritivo dos aspectos mais relevantes de estudos de prevalência da mutação *TP53* p.Arg337His em diferentes grupos de pacientes com câncer de mama.

Apêndice

Tabela 1a: Distribuição detalhada da idade ao diagnóstico de câncer de mama das participantes do estudo (comparação com dados do Hospital Fêmeina).

Tabela 2a: Comparação de dados demográficos e clínicos de pacientes com câncer de mama atendidos em dois hospitais públicos distintos: Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital Fêmeina.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais manifestações clínicas que levam à suspeição de síndromes de câncer de mama hereditário.

Quadro 2: Breve linha do tempo acerca de alguns acontecimentos relacionados à mutação *TP53* p.Arg337His.

RESUMO

A neoplasia maligna de mama é a principal causa de morte por câncer em mulheres. No Brasil, corresponde a cerca de 28% dos novos casos relatados anualmente neste gênero, sendo o Rio Grande do Sul o estado com a segunda maior incidência desta patologia. Estima-se que pelo menos 10% dos casos de câncer de mama (CM) sejam hereditários. Entre estes, tem-se pacientes com as Síndromes de Li-Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni-*like* (LFL), condições autossômicas dominantes que decorrem de mutações germinativas no gene *TP53* e cujo espectro fenotípico inclui predisposição a múltiplos tumores em idade jovem, como o CM pré-menopáusicos. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a variante *TP53* p.Arg337His foi identificada em uma frequência populacional de 0,3%, a maior já descrita para uma variante neste gene. Até o momento, diversos estudos em grupos de pacientes com CM revelaram uma ampla variação de prevalências desta mutação (0,5-8,7%), o que torna importante a execução de mais trabalhos nesta área. Assim, com intuito de melhor elucidar a contribuição desta variante patogênica no contexto do CM, o objetivo principal deste trabalho foi determinar a frequência de portadores de *TP53* p.Arg337His em uma série de 315 pacientes diagnosticadas com CM no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As genotipagens foram realizadas por meio de PCR em tempo real (TaqMan®) e resultaram em uma prevalência de 0,3% (1/315), o mesmo valor já descrito para a população em geral das regiões Sul e Sudeste do Brasil. A única portadora apresentou o mesmo haplótipo previamente descrito como fundador e, em seu tecido tumoral de mama, a mutação também foi observada em heterozigose. Sua história familiar foi relatada como positiva para câncer, já a sua história pessoal incluiu CM aos 67 anos e adenocarcinoma gástrico dois anos depois, os dois tumores já descritos como os mais frequentes em adultos portadores desta mutação. A baixa frequência mutacional nesta série pode, em parte, ser explicada pelo delineamento amostral, que não considerou história familiar compatível com síndromes genéticas de predisposição hereditária ao câncer como critério de inclusão, e o fato de apenas 20% da amostra ter sido diagnosticada com CM antes dos 45 anos, idade considerada um limiar importante para a SLF e LFL.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the leading cause of death by cancer in women. In Brazil, it accounts for about 28% of new cancer cases reported annually and the state of Rio Grande do Sul presents the second highest incidence of this type of cancer. At least 10% of all BC are hereditary. As an example, germline mutations in *TP53* gene are associated with Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni-like (LFL) Syndromes, autosomal dominant disorders that predisposes to a multiple early onset tumors, including premenopausal BC (before age 45). In the Southern and Southeastern regions of Brazil, the *TP53* p.Arg337His germline mutation was identified in a populational frequency of 0.3%, the highest value described for a germline variation in this gene. To date, several studies in patients with BC showed a wide range of *TP53* p.Arg337His prevalence (0.5-8.7%). Thus, in order to collaborate with data and to better understand the contribution of this mutation in BC, the main goal of this study was to estimate the frequency of this variant in a series of 315 patients diagnosed with BC at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The genotyping was performed by real-time PCR (TaqMan®) and revealed a 0.3% (1/315) prevalence, similar to the one described in the general population from Southern and Southeastern regions of Brazil. The only *TP53* p.Arg337His carrier had the mutation confirmed by Sanger sequencing and showed the same haplotype previously described as founder. Analysis of the patient's tumor confirmed the diagnosis of invasive ductal carcinoma and in tumor tissue the mutation was also observed in heterozygosis. The carrier reported a positive family history of cancer and her personal history included BC at 67 years and gastric adenocarcinoma two years later, both tumors previously described as the more frequent in adult carriers of *TP53* p.Arg337His. The low frequency found could be partially explained by the experimental design, which did not consider family history consistent with hereditary predisposition to cancer as inclusion criteria, and the fact that only 20% of the sample presented premenopausal BC, which can hinder observation of this variant.

Capítulo I
Revisão da Literatura

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

O termo câncer é utilizado para designar um grupo de mais de cem doenças que apresentam uma característica em comum: a proliferação anormal de células com vantagens seletivas e potencial de invasão de tecidos adjacentes e à distância (ACS).

A carcinogênese é um processo complexo decorrente de alterações genéticas, epigenéticas, ambientais e metabólicas que afetam diretamente o controle do ciclo e desenvolvimento celular. Processos regulados por oncogenes, como estímulo à proliferação e ao crescimento, e por genes supressores tumorais, que inibem eventos proliferativos, são de fundamental importância para que este controle seja adequado. Assim, mutações que acarretem perda ou ganho de função nestes genes estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento tumoral (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

A malignização, consequência de alterações estruturais e/ou funcionais de proteínas essenciais ao controle do ciclo celular, ocasiona uma reprogramação metabólica e reorganização do ambiente peritumoral. Estes eventos são responsáveis por oferecer ao tumor* as condições necessárias ao seu crescimento, remodelamento tecidual, invasão e metástase. Além disso, durante o seu estabelecimento, o tumor cria microambientes que afetam células vizinhas e que promovem, entre outros eventos, vascularização e inflamação, além de inibição da resposta imune local (MISHRA; AMBS, 2015).

No mundo, cerca de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas com algum tipo de câncer todos os anos. Mais da metade destes indivíduos morre devido a esta causa: aproximadamente 8 milhões (figura 1 – GLOBOCAN, 2012). A maioria dos cânceres é esporádica (em torno de 90%). Nesses casos, os fatores associados ao seu desenvolvimento ainda não são totalmente compreendidos. Acredita-se ser o resultado de uma combinação entre o acúmulo de danos causados por fatores ambientais – como dieta, envelhecimento, tabagismo, alcoolismo, entre outros - e por variantes genéticas com pequeno efeito (INCA).

*A designação “tumor” significa apenas massa tecidual originada por proliferação anormal de células. No entanto, para simplificação do texto, sempre que essa palavra for utilizada, se referirá a tumor maligno, um sinônimo para câncer.

Pelo menos 10% dos cânceres são hereditários. Nestes casos, uma mutação germinativa em um gene de predisposição ao câncer é herdada, o que faz com que familiares de primeiro grau - pais, irmãos e filhos - apresentem 50% de chance de também portar a variante patogênica. Dentre os fatores que levam à suspeição de câncer hereditário (CH), está a idade precoce ao diagnóstico (dez anos antes da idade média ao diagnóstico do tumor na população em geral), múltiplos tumores primários em um mesmo indivíduo e diversos casos de câncer em uma mesma família (ACS, INCA).

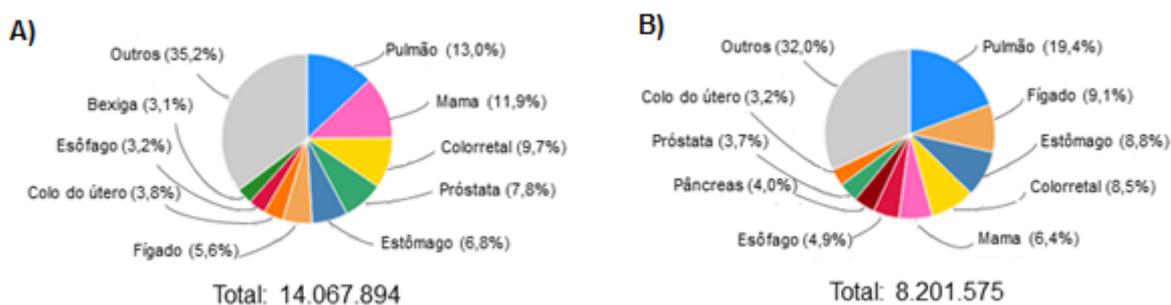


Figura 1: Estimativas de câncer no mundo. Demonstração dos dez tipos de tumores malignos mais incidentes (A) e com maior mortalidade (B) - GLOBOCAN 2012.

1.2 Câncer de mama

Em mulheres, o tumor de mama é o tipo de câncer diagnosticado com maior frequência* e se constitui na principal causa de morte por câncer nesse gênero. No cenário mundial, o Brasil se configura como o quinto país com a maior incidência de câncer de mama (CM) - figura 2. Nacionalmente, isto corresponde a 28% dos novos casos de câncer relatados anualmente, sendo o Rio Grande do Sul (RS) o estado com a segunda maior incidência: 87,72 novos casos de CM a cada 100 mil mulheres, comparado a uma incidência de 57,12, taxa referente ao Brasil consolidado – todas as regiões (INCA, 2016). A avaliação do período de tempo entre os anos de 1980-2011 indica que as taxas de mortalidade em mulheres com diagnóstico antes dos 50 anos são crescentes no Brasil (MARTINS et al., 2013). No RS, uma importante parcela de internações e mortes em mulheres na faixa etária de 40-49 anos ocorre devido ao CM (GROSS et al., 2014).

*Excetuando-se o câncer de pele não-melanoma.

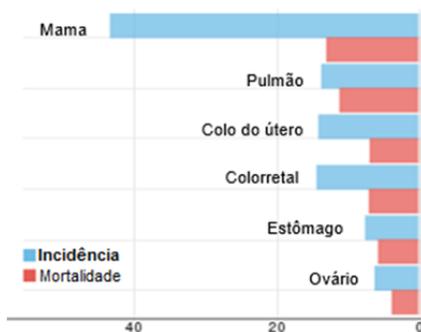
Câncer de mama em mulheres: dados mundiais e nacionais

Mundo

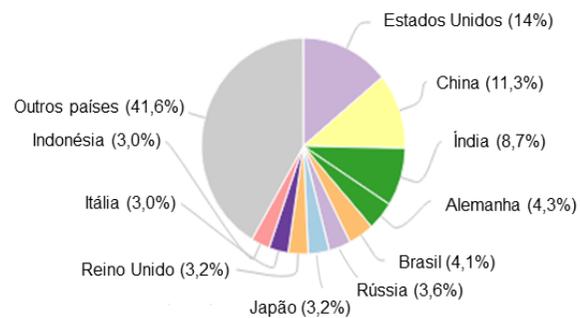
Câncer mais incidente e com maior mortalidade

1.658.872 novos casos ao ano

519.507 mortes por ano



Incidência e mortalidade por tipo de câncer em mulheres



Ranking dos países com maior número de novos casos de câncer de mama (2012)

Brasil

5º colocado em número de casos no cenário mundial

Por ano

28,1% de todos os casos diagnosticados são tumores de mama o que significa

57.960 novas mulheres com câncer de mama ou

56,2 novos casos a cada 100.000 mulheres

Rio Grande do Sul

2º colocado em incidência ou

90,2 novos casos a cada 100.000 mulheres ao ano

Fonte: GLOBOCAN (2012); INCA (2016)

Figura 2: Panorama epidemiológico do câncer de mama em mulheres, dados mundiais e brasileiros.

A mama é um órgão heterogêneo predominantemente composto por tecido adiposo, que comporta em seu interior: lobos, estruturas que contêm as glândulas produtoras de leite; ductos, canais que interconectam as glândulas e levam o leite até os mamilos; tecido conjuntivo, envolvido na sustentação física; e vasos, sanguíneos e linfáticos, que nutrem e drenam o tecido mamário (RAMIÃO et al., 2016). Mais de dez tipos histológicos de CM são reconhecidos, porém a maioria tem como origem as células epidérmicas dos ductos – o que os caracteriza como carcinoma ductal. Quanto à capacidade de invasão, os tumores são classificados como invasivos ou *in situ*, neste último quando as células não adquiriram capacidade de infiltrar em outros tecidos (ACS²).

O desenvolvimento do tumor de mama está associado a uma combinação de fatores ambientais e genéticos, o que o caracteriza como multifatorial. Na população geral, a idade é um dos principais fatores de risco: 80% dos casos ocorrem após os 50 anos (ANDERS et al., 2009). Além disso, o estilo de vida adotado possui relação com a sua ocorrência. Sedentarismo, obesidade, dieta desequilibrada, tabagismo e alcoolismo são aspectos associados a um risco aumentado (FERRINI et al., 2015; MAGNÉ et al., 2011). Em relação a questões reprodutivas, uma gestação completa e a amamentação parecem diminuir o risco. Quanto à ocorrência de aborto e ao uso de contraceptivos hormonais, ainda não há um consenso estabelecido (ACS²; SCHNEIDER et al., 2014; ZHONG et al., 2015).

O tecido mamário responde às flutuações hormonais inerentes ao ciclo menstrual. Assim, condições que prolonguem a exposição aos estrogênios endógenos - como menarca em idade precoce e menopausa tardia - são fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de CM. Isto porque este grupo de hormônios estimula a proliferação celular, diminui a taxa de apoptose e aumenta a chance de que danos ao DNA se acumulem ao longo do tempo (BROWN; HANKINSON, 2015).

Uma em cada oito mulheres vai desenvolver CM ao longo de sua vida, o que equivale a um risco geral de 12,5%. Dentre estes casos, estima-se que pelo menos 10% sejam hereditários, o que no Brasil, representaria quase 6 mil novos casos ao ano (INCA, 2016). Neste contexto de predisposição hereditária, o risco cumulativo vital para o CM pode chegar a 87%, dependendo da alteração genética considerada (tabela 1), além de uma maior chance de desenvolvimento de outros tumores (PEDERSON et al., 2016).

Tabela 1: Principais síndromes de predisposição ao câncer hereditário que incluem o câncer de mama em seu espectro fenotípico. Adaptado de APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013; PEDERSON et al., 2016; CYBULSKI et al., 2011 e MYRIAD, 2014.

Síndrome	Gene associado	Risco cumulativo*	Outros tipos de tumores	Incidência
HBOC	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	Até 87%	Ovário, CM masculino, próstata, pâncreas, melanoma (<i>BRCA2</i>)	1:400-800
Cowden	<i>PTEN</i>	25-50%	Útero, rim, colorretal, tireoide, melanoma	1:200.000
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	56-90%	Sarcomas, cérebro, glândula adrenocortical.	1:20.000
Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	45-50%	Intestino grosso, pâncreas, gônadas, cérvix	1:50.000-200.000
HDGC	<i>CDH1</i>	39-52%	Estômago	Indeterminada
HBCC	<i>CHEK2</i>	23-48%	Colorretal, próstata	Indeterminada
Associada a <i>PALB2</i>	<i>PALB2</i>	20-40%	Pâncreas	Indeterminada
Associada a <i>ATM</i>	<i>ATM</i>	17-52%	Pâncreas	Indeterminada

CM: Câncer de Mama; HBCC: *Hereditary Breast and Colorectal Cancer* (Câncer de mama e colorretal hereditários); HBOC: *Hereditary Breast and Ovarian Cancer* (Câncer de mama e ovário hereditários); HDGC: *Hereditary Diffuse Gastric Cancer* (Síndrome do Câncer Gástrico Difuso).

*Risco cumulativo de câncer de mama até os 80 anos.

A figura 3 demonstra a frequência de alterações germinativas com diferentes penetrâncias em pacientes com diagnóstico ou suspeita clínica de câncer de mama hereditário (CMH). A maior parte das síndromes de predisposição hereditária é causada por mutações de perda de função em genes supressores tumorais. Metade das causas genéticas relacionadas ao CMH ainda é desconhecida (51%). Dentre as alterações moleculares já identificadas (49%), as mutações germinativas de alta penetrância em genes de predisposição representam a maioria: 30% dos casos, sendo 25% correspondentes a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast Cancer 1, 2*) e 5% alterações em outros genes de alta penetrância, como *TP53*, *STK11*, *PTEN* e *CDH1* (CORNEJO-MORENO; URIBE-ESCAMILLA; SALAMANCA-GÓMEZ, 2014; LARSEN et al., 2014; MELCHOR; BENÍTEZ, 2013).

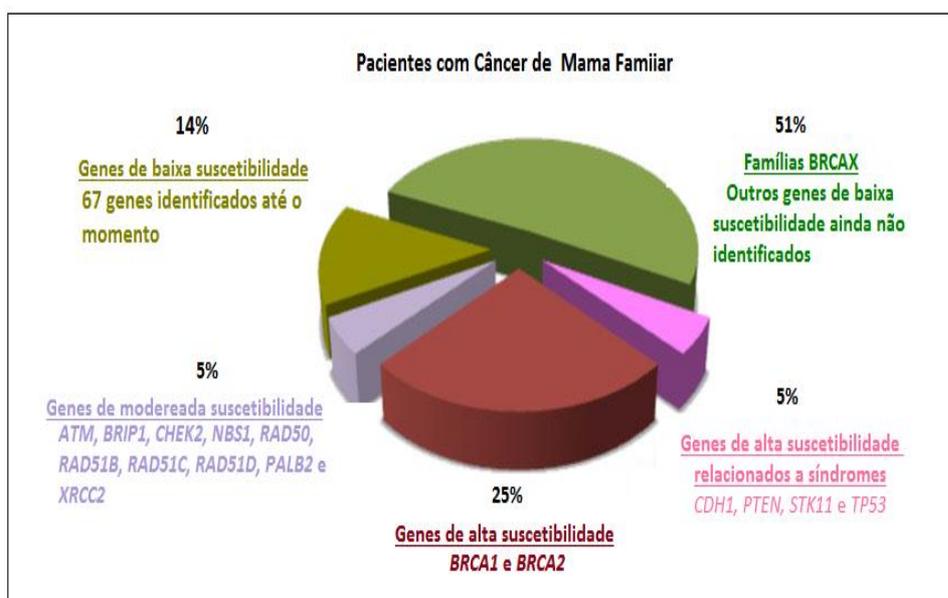


Figura 3: Distribuição de mutações germinativas associadas à predisposição ao câncer de mama hereditário. Adaptado de MELCHOR; BENÍTEZ, 2013.

Além do CM, mutações nestes genes estão associadas a diferentes perfis de tumores observados em uma família. Na tabela 1, são citadas as principais síndromes que incluem o CM em seu espectro fenotípico. Além disso, são listados o risco de desenvolvimento deste tipo de neoplasia maligna, bem como de outros tumores, e a incidência dessas síndromes na população em geral.

Para o entendimento da parcela de famílias sem diagnóstico molecular (51% do total), o assim chamado *missing heredity*, tem-se estudado variantes em regiões não codificantes – que podem alterar *splicing* e/ou expressão gênica, além de microRNAs relacionados e modificações epigenéticas - como metilação em promotores de genes com sabida importância – com intuito de melhor caracterizar os fatores causais da predisposição a esta patologia (EVANS-KNOWELL; LARUE; FINDLAY, 2017; RICH et al., 2015; WALSH et al., 2016).

O número de pacientes que apresenta esta predisposição é relativamente pequeno, entretanto, existe um potencial tanto para a detecção precoce quanto para a terapia que justificam o investimento nesta área da medicina. A identificação de novas mutações, bem como uma triagem cuidadosa para as já conhecidas, e o entendimento de outros fatores genéticos adicionais são aspectos que contribuem para melhor caracterização e manejo da doença e que permitem o aconselhamento genético de probandos e familiares.

Na prática clínica, alguns fatores levam à suspeição de um risco aumentado para o CMH. No quadro 1 são citados alguns dos critérios adotados pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para encaminhar pacientes para a testagem genética (SMITH; MESTER; ENG, 2014).

Quadro 1: Principais manifestações clínicas que levam à suspeição de síndromes de câncer de mama hereditário.

1. Câncer de mama (em qualquer um dos casos abaixo):
 - antes dos 50 anos
 - bilateral em qualquer idade
 - triplo negativo*
 - masculino em qualquer idade
 - ou: ovário, pâncreas e próstata em indivíduos com ascendência Ashkenazi.
2. Câncer de ovário em qualquer idade
3. Cânceres em múltiplos indivíduos e gerações de uma família

* Nesse tipo de CM, geralmente mais agressivo, os três receptores testados por imunistoquímica são negativos (Receptores de Estrogênio e Progesterona e HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor 2*).

O uso de ferramentas acessíveis que auxiliem na triagem de pacientes com perfil compatível com CMH é essencial. Em 2009, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um simples questionário de sete perguntas para detectar mulheres que devem ser encaminhadas para o teste genético. A validação foi realizada após a aplicação em um grande grupo de mulheres atendidas em unidades de atenção primária na região Sul do Brasil. Atualmente, esta ferramenta é reconhecida internacionalmente e indicada como um dos métodos a ser utilizados na prática clínica (ASHTON-PROLLA et al., 2009).

A testagem molecular é o passo seguinte no processo de investigação do CMH. Serviços relacionados à oncogenética estão ao alcance de apenas cerca de 5% da população brasileira. O Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro ainda não

disponibiliza estes exames, o que acarreta em um subdiagnóstico de síndromes de predisposição hereditária ao câncer e a impossibilidade de prestar aconselhamento genético a pessoas e familiares com quadro suspeito. Muitos pacientes possuem suas alterações genéticas confirmadas somente por meio de participação em projetos de pesquisas ou de diagnóstico em clínicas/laboratórios particulares (ASHTON-PROLLA et al., 2016)

Após a identificação de mutações germinativas de importância clínica, durante o aconselhamento genético, algumas medidas de redução de risco ou que auxiliem no diagnóstico precoce podem ser indicadas, como exames clínicos e rastreamento por imagem mais frequentes, adenomastectomia bilateral redutora de risco, quimioprevenção – uso de drogas que bloqueiam receptores hormonais e que inibem a sua formação, entre outros (PEDERSON et al., 2016) . Além disso, os cuidados podem se estender a familiares em risco.

1.3 Proteína p53 e gene *TP53*

Em sua forma funcional, a proteína p53 é um fator de transcrição com papel central na regulação e no controle do ciclo celular (figura 4). Sua atividade está relacionada à manutenção da estabilidade genômica - através da promoção de reparos no DNA, controle de apoptose, senescência e inibição do ciclo celular. A regulação adequada destes processos diminui a chance de que células com danos se repliquem de forma descontrolada. Além disso, este peptídeo está envolvido em outros processos celulares, como no estresse oxidativo e no metabolismo energético, participando, por exemplo, da inibição da rota glicolítica em situações de privação de glicose (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014).

Proteínas p53 mutantes comumente se acumulam no núcleo e adquirem funções que interferem de forma drástica no funcionamento celular, contribuindo para a carcinogênese. Eventos decorrentes de atividade anormal desta proteína, como alterações estruturais na cromatina e instabilidade genômica, levam à ativação de genes-chave que impactam o metabolismo celular, a atividade proteossômica e a biogênese de microRNAs. Tais modificações conferem vantagens seletivas às células e estão diretamente relacionadas ao crescimento e à agressividade do tumor (MANTOVANI; WALERYCH; SAL, 2016).

Especificamente, em relação ao metabolismo energético, células com p53 mutantes apresentam maior captação de glicose e aumento da glicólise seguida de fermentação láctica, a principal forma de aquisição de energia por células tumorais. Este aumento na via glicolítica é observado mesmo em condições onde o oxigênio é abundante, situação em que a respiração aeróbica deveria ser favorecida, e foi definido como Efeito Warburg. Evidências mais recentes demonstram que esse desvio no metabolismo energético parece ser um processo que auxilia tanto no crescimento quanto na manutenção do tumor (BENSAAD; VOUSDEN, 2007; GATENBY; GILLIES, 2004).

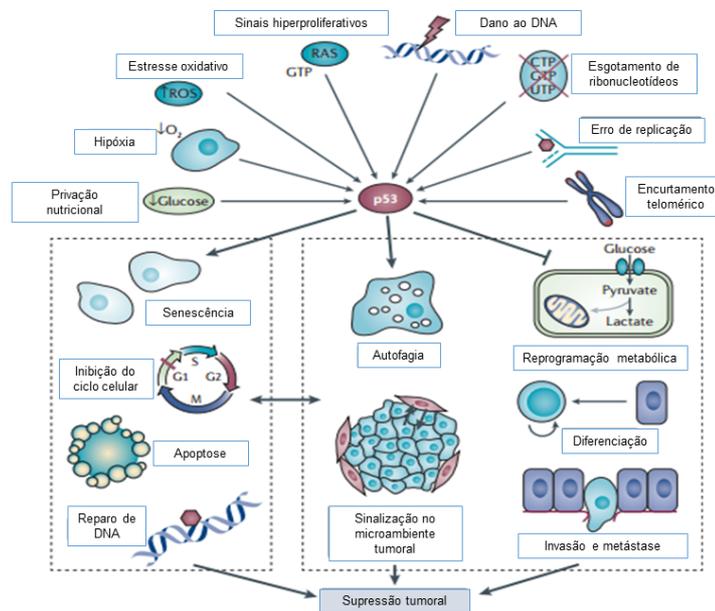


Figura 4: Visão geral de processos envolvidos na supressão tumoral por p53.
Adaptado de BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014.

Estruturalmente, p53 é um homotetrâmero (FRIEDMAN et al., 1993), sendo cada monômero constituído por cinco domínios distintos: dois aminoterminais envolvidos na transativação, um rico em prolinas, um de ligação ao DNA, um de oligomerização e, por fim, um domínio carbóxi-terminal de regulação – figura 5 (SORRELL et al., 2013).

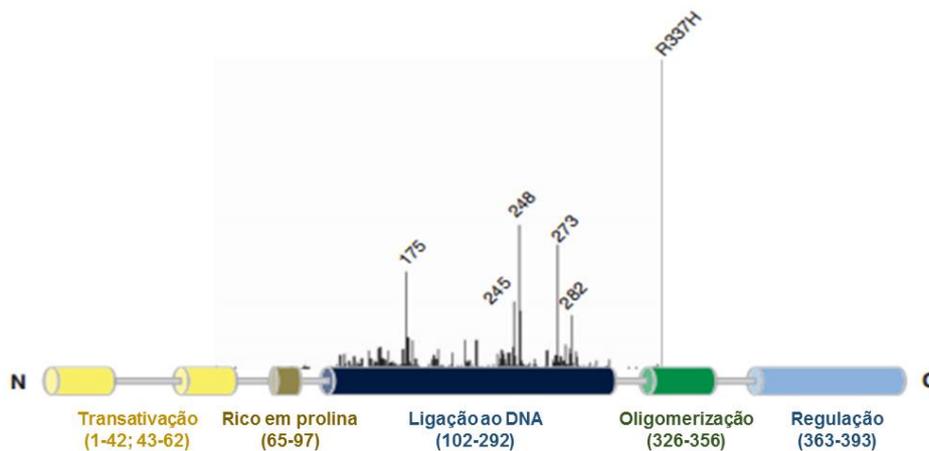


Figura 5: Domínios da proteína p53 e mutações germinativas associadas a câncer em humanos. Adaptado de ACHATZ; ZAMBETTI, 2016.

Localizado na região cromossômica 17p13.1, *TP53* é um dos genes supressores de tumor mais estudados no mundo. Sua estrutura é composta por 11 éxons, sendo os de número 2 a 10 os que codificam os 393 aminoácidos da proteína p53 (ENSEMBL; NCBI). Mutações somáticas neste gene estão presentes em cerca de 50% dos tumores sólidos e fazem com que *TP53* seja o gene mais frequentemente mutado em diferentes tipos de cânceres (IARC *TP53*).

Quanto às mutações germinativas, 891 variantes patogênicas distintas foram descritas até o momento. Destas, mais de 70% são de ponto e do tipo troca de sentido, sendo quase metade transições de G>A em sítios CpG (IARC *TP53*). A ocorrência destas mutações está associada à Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e a sua variante, Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL), condições com padrão de herança autossômica dominante que predispõem a múltiplos tumores de início precoce (MALKIN, 2011; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010). Estima-se que o risco cumulativo para o desenvolvimento de pelo menos um tumor primário em portadores destas síndromes seja de cerca de 80% até os 50 anos de idade, valor muito acima do risco observado para a população geral na mesma faixa etária – 1-5% (MALKIN, 2011).

Um levantamento da frequência de tumores observados em 1.509 portadores de mutações germinativas em *TP53* (figura 6), revelou que o câncer de mama é a manifestação mais frequente desta síndrome, seguido de tumores de tecidos moles, cérebro e glândula adrenal – principalmente em crianças - e ossos. Juntos, estes tumores respondem por mais de 70% do total de casos (BOUAOUN et al., 2016).

Apesar de recentemente ter sido levantada a hipótese de que mutações germinativas no gene *PTEN* possam ter alguma relação com a SLF (AKOUCHEKIAN et al., 2016), até o momento, o gene *TP53* é o único associado à síndrome e, aproximadamente, 70% das famílias com fenótipo clássico da síndrome apresentam mutações germinativas neste gene (MERINO; MALKIN, 2014).

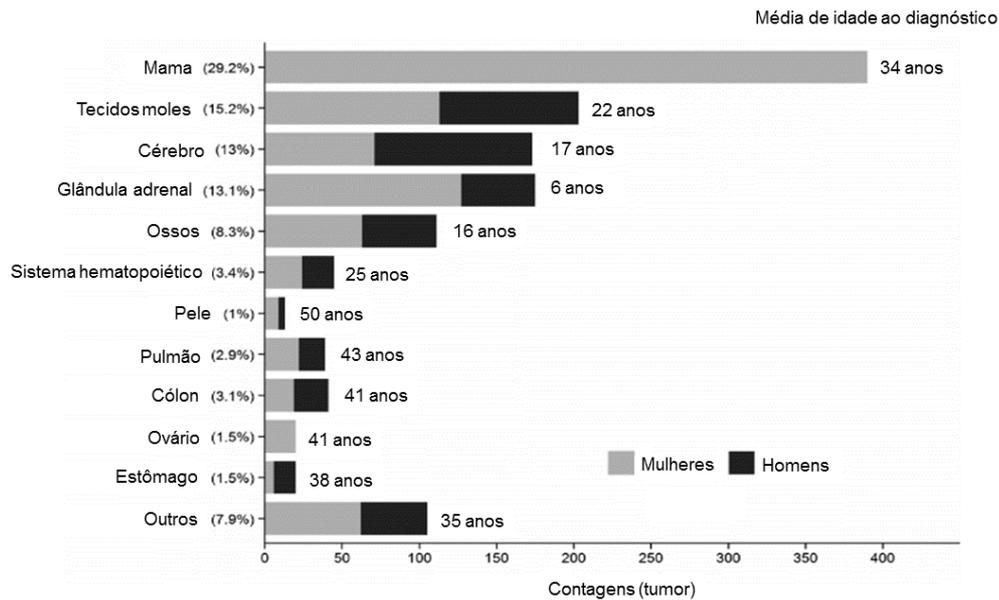


Figura 6: Frequência dos diferentes tipos de tumores em 1.509 portadores de mutações germinativas em *TP53*. Nas barras, são indicadas as proporções em ambos os sexos, seguidas da média de idade ao diagnóstico. Adaptado de BOUAOUN et al., 2016.

Cerca de 80% das mutações germinativas em *TP53* estão localizadas no domínio de ligação ao DNA e são denominadas clássicas – figura 5 (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014). Comumente, estas variantes afetam de forma drástica a interação entre p53 e o DNA e se associam a um fenótipo altamente penetrante. Alterações no domínio de oligomerização são menos frequentes na maioria das populações e geralmente têm menor impacto clínico, pois estão relacionadas a um fenótipo de penetrância reduzida. No entanto, é interessante ressaltar que este domínio, responsável pela dimerização dos monômeros e posterior formação da holoproteína, é essencial para que p53 desempenhe sua função de ativador transcricional e regule outros genes envolvidos nos processos relacionados à supressão tumoral (CHÈNE, 2001).

1.4 Mutação TP53 p.Arg337His (c.1010G>A)

Uma breve linha do tempo de achados relacionados   variante TP53 p.Arg337His (rs121912664), tratada de forma genérica como R337H, está descrita no quadro abaixo.

Quadro 2: Breve linha do tempo acerca de alguns acontecimentos relacionados   muta o TP53 p.Arg337His.

2001

Descri o em um grupo de crianças com carcinoma adrenocortical (Paraná, Brasil).

(RIBEIRO et al., 2001)

Dos 36 pacientes estudados, 35 eram portadores desta muta o (prevalência de 97%). A princípio, o artigo original sugere que a muta o contribui de maneira tecido-específica para o desenvolvimento do CAC. No entanto, a alta prevalência desta muta o despertou curiosidade e abriu espaço para investiga es posteriores.

2007

Associa o desta muta o com a SLF pela primeira vez.

(ACHATZ et al., 2007)

2008

A primeira frequência populacional da muta o foi estabelecida em 0,3%.

(PALMERO et al., 2008)

A análise foi realizada em 750 mulheres saudáveis que participavam de um programa de monitoramento preventivo para o câncer de mama no RS. Esta frequência   de 10 a 20 vezes maior do que qualquer outra altera o germinativa descrita para TP53.

A testagem molecular desta muta o foi incluída no programa de triagem neonatal do estado do Paraná.

2010

O efeito fundador da muta o foi demonstrado.

(GARRITANO et al., 2010)

O estudo foi feito através da genotipagem de 29 tagSNPs localizados no cromossomo 17.

2015

Determina o da provável origem da muta o como portuguesa.

(PASKULIN et al., 2015)

Além disso, o efeito fundador foi corroborado. Desta vez, através da genotipagem de Short Tandem Repeats (STRs) que se estendem ao longo do cromossomo 17.

2008 – atualmente

Diversos estudos envolvendo mulheres com câncer de mama revelaram uma prevalência altamente variável desta muta o (0,5-8,7%) e destacaram a relevância desta muta o no contexto desta patologia*.

* Este t pico será abordado com maior detalhe no artigo científico II, capítulo V.

Em termos moleculares, esta mutação é uma transição G>A que ocorre em um sítio CpG localizado no domínio de oligomerização de p53 (éxon 10) e que surge, provavelmente, devido a uma deaminação espontânea (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016).

Estudos indicam que a substituição de uma arginina por uma histidina na posição 337 afeta a dimerização de monômeros de p53 de uma maneira dependente de pH. Isto porque uma ponte de hidrogênio estável entre os resíduos de histidina na posição 337 de um monômero e o aspartato na posição 352 do monômero adjacente tende a se desfazer em condições de pH ligeiramente alcalinas (próximo a 8). Já em pH neutro, a proteína parece reter parcialmente a sua função de supressora tumoral, de forma a se assemelhar à atividade da proteína selvagem (DIGIAMMARINO et al., 2002; HAINAUT, 2002; LWIN; DURANT; BASHFORD, 2007).

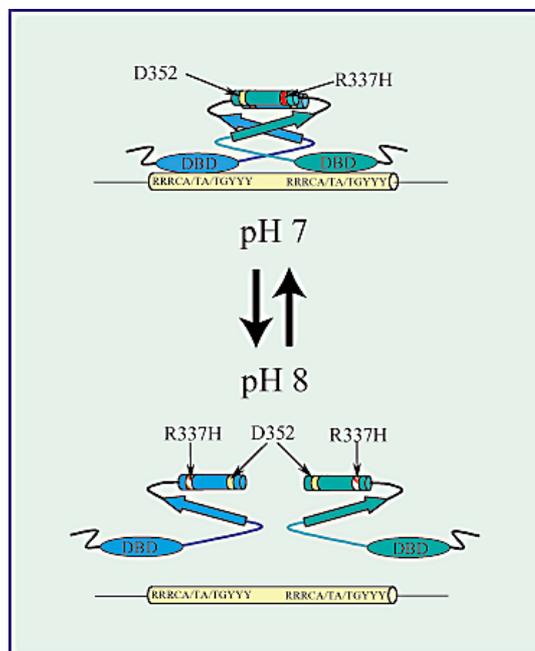


Figura 7: Esquemática do efeito da substituição de uma arginina por uma histidina no códon 337 de p53 sobre formação de tetrâmeros funcionais em pH levemente alcalino. (HAINAUT, 2002).

De maneira geral, a mutação aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de forma heterogênea e, devido a sua alta frequência populacional (cerca de 0,3%), pode ser considerada uma questão de saúde pública. Polimorfismos, alterações genéticas ainda não conhecidas e fatores ambientais são alguns dos aspectos que podem agir como modificadores de fenótipo, contribuindo para a heterogeneidade observada (ACHATZ; BERNTANI, 2008; ACHATZ; ZAMBETTI, 2016).

A mutação parece ter um efeito mais pronunciado no carcinoma adrenocortical (CAC), um tumor raro e com um prognóstico ruim, caso não detectado em estágio inicial. Por conta da elevada frequência da mutação, no Brasil, esse tumor ocorre em uma escala de 10-15 vezes maior do que no restante do mundo, e diversos estudos têm demonstrado a contribuição desta variante no contexto desta doença (CUSTODIO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2001). No CAC, comumente são observadas outras alterações que podem ser importantes para o seu desenvolvimento: a perda de heterozigidade do cromossomo 17 - alelo selvagem de *TP53* – e da região que engloba parte do braço curto do cromossomo 11 (11p15), além da amplificação da região cromossômica 9q (PINTO et al., 2015).

Já o câncer de mama é o tipo de tumor diagnosticado com maior frequência em adultos portadores desta mutação. Sua manifestação tende a ser mais tardia em relação a portadores de mutações no domínio de ligação, por volta dos 40 anos, em comparação a 32 anos em portadores de mutações clássicas (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016). Outros cânceres frequentes incluem o de estômago e cérebro, o que evidencia que o perfil de tumores apresentados por portadores da variante R337H é distinto da SLF clássica (GISLAINE CUSTÓDIO, 2011).

A ampla variação de prevalências em estudos com pacientes diagnosticados com CM gera questionamentos: a alta frequência é determinada por aspectos geográficos ou é mais prevalente em mulheres com características específicas? Isto torna interessante a análise de mais grupos, a fim de se identificar os fatores que contribuem para essa variabilidade.

Sob a perspectiva do aconselhamento genético, a testagem molecular desta mutação é de fundamental importância para a tomada de decisões preventivas, como monitoramento mais frequente e precoce de pessoas consideradas em risco. Nesse caso, um resultado positivo pode ser determinante para investigação de familiares que antes não seriam testados, como crianças, já que nesta síndrome tumores de infância são frequentes.

Capítulo II
Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que:

1. O Rio Grande do Sul apresenta a segunda maior incidência de câncer de mama no Brasil, sendo Porto Alegre a capital que, proporcionalmente, mais diagnostica este tipo de câncer.
2. O câncer de mama pré-menopáusico é a manifestação mais frequente da Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes, condições que decorrem de mutações germinativas de *TP53*.
3. Uma mutação germinativa específica de *TP53*, p.Arg337His, foi identificada em alta frequência populacional nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (cerca de 0,3%) e já foi associada a um risco considerável de desenvolvimento de diversos tumores, incluindo o câncer de mama.
4. Estudos de prevalência da mutação *TP53* p.Arg337His em grupos de pacientes com câncer de mama revelaram uma ampla variação de frequências desta mutação.

A justificativa deste trabalho reside na necessidade de se avaliar a prevalência desta mutação em mais grupos de pacientes com câncer de mama, nesse caso, em uma série de casos proveniente de um hospital público do RS, além de analisar diversos estudos já publicados sobre este tema, a fim de que o papel da mutação p.Arg337His possa ser melhor elucidado no contexto da neoplasia maligna de mama.

Capítulo III
Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estimar a frequência da mutação germinativa *TP53* p.Arg337His em uma série de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, provenientes de um hospital público do estado do Rio Grande do Sul.

3.2 Específicos

3.2.1 Descrever a frequência da mutação *TP53* p.Arg337His na linhagem germinativa de 315 pacientes não relacionadas, atendidas no Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e diagnosticadas com câncer de mama entre os anos 2002 e 2010.

3.2.2 Estabelecer relação entre os resultados das genotipagens e os dados demográficos, clínicos, patológicos e da história familiar dos pacientes.

3.2.3 Confirmar, entre as portadoras identificadas, se a mutação incide sobre o mesmo bloco haplotípico previamente descrito como fundador.

3.2.4 Colaborar com informações acerca da prevalência desta mutação em pacientes com câncer de mama.

Capítulo IV
Artigo Científico I

TP53 p.Arg337His germline mutation prevalence in a breast cancer cohort in Southern Brazil is similar to the populational frequency of the mutation in this same region.

4. Artigo Científico I

Artigo formatado segundo normas da revista *Familial Cancer*,
modalidade *Short Communication*.

TP53 p.Arg337His germline mutation prevalence in a breast cancer cohort in Southern Brazil is similar to the populational frequency of the mutation in this same region.

Eriza Cristina Hahn^{1,2,3}, Camila Matzenbacher Bittar^{2,4}, Cristina Brinckmann Oliveira Netto⁴, Jorge Villanova Biazús⁵, Rodrigo Cericatto⁵, Sandra Leistner-Segal^{3,4}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,4*}, HCPA Breast and Ovarian Cancer Collaborative Group⁵.

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

²Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica do HCPA, Porto Alegre, Brazil.

⁴Serviço de Genética Médica do HCPA, Porto Alegre, Brazil.

⁵Serviço de Mastologia do HCPA, Porto Alegre, Brazil.

HCPA Breast and Ovarian Cancer Collaborative Group:

José Antônio Cavalheiro, Márcia Portela de Melo, Carlos Henrique Menke, Eliane Rabin.

***Corresponding author**

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Departament of Genetics, UFRGS

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90.035-903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail: pprolla@hcpa.edu.br

Tel: +55 513359-8011

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the leading cause of death by cancer in women. In Brazil, it accounts for about 28% of new cancer cases reported annually and the state of Rio Grande do Sul, Southern of Brazil, is the second in BC incidence. Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni-like (LFL) Syndromes are cancer predisposition disorders caused by germline mutations in *TP53*, in which premenopausal BC is a core tumor. In the Southern and Southeastern regions of Brazil, a specific *TP53* germline mutation, p.Arg337His, was identified at a populational frequency of 0.3%, the highest value described for any germline variation in this gene. In Brazilian patients with BC, different studies showed a wide variation in carrier frequencies, range from 0.5% to as high as 8.7%. To contribute to this ongoing debate, the current study assessed carrier frequency among 315 BC patients unselect for age and family history (FH) - group 1 - and 199 patients diagnosed with BC at or below 45 years and without FH criteria for LFS or LFL - group 2. Genotyping resulted in the identification of one carrier (1/315; 0.3%) in group 1 and four carries (4/199; 2.0%) in group 2. The low mutation frequency in group 1 could be related to experimental design, which did not considered FH or did not restrict testing by age. Further studies in larger samples of BC patients of different ages are necessary to provide more definitive *TP53* p.Arg337His carrier frequencies in different clinical scenarios. Cost-effectiveness studies would contribute to assess if all women from Southern Brazil with premenopausal breast cancer, regardless of family history, should be routinely tested for this mutation.

INTRODUCTION

Breast Cancer (BC) is the leading cause of death by cancer in women. In Brazil, BC incidence accounts for about 28% off all cancers cases diagnosed every year [1]. Most cases are sporadic (approximately 90%) and develop due to a combination of environmental and genetic risk factors, like low penetrance genetic variants with small effect [2, 3]. However, about 10% of diagnoses, corresponding to more than 160,000 new cases per year [1], are inherited and caused by moderate or high penetrance germline mutations in cancer predisposition genes. Although the exact molecular alteration leading to Hereditary Breast Cancer (HBC) is still unknown in about half of these cases, germline mutations in several tumor suppressor genes have been identified in association with premenopausal breast cancer, including the *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* genes, among others [4].

TP53 encodes the p53 protein, a transcription factor with a central role in the control and regulation of events related to the cell cycle, which is activated in response to several events, including DNA damage and hypoxia [5]. Approximately 50% of solid tumors have somatic mutations in *TP53*, which makes it the most frequently mutated gene in different types of cancers [6]. Germline mutations, on the other hand, are associated with Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni-like (LFL) Syndromes, dominant autosomal disorders that predispose to multiple early-onset tumors, including premenopausal BC. In these syndromes, the estimated risk of developing at least one primary tumor by age 50 is around 80% [7].

Germline mutations in *TP53* occur at a very low frequency in the general population (1:2000-5000 individuals) [8]. However, in the Southern and Southeastern regions of Brazil, one specific germline *TP53* mutation, p.Arg337His, also known as R337H, was identified at a population frequency of 0.3%, which is much higher than any other alteration already described in this gene [9, 10].

The first report of the p.Arg337His mutation in Brazil was in a cohort of children with apparently isolated adrenocortical carcinoma (ACC), in which 97% were carriers [11]. The high frequency led mutation analysis in other cancer groups. In 2007, the association with LFS was confirmed in a report of families from different Brazilian states [12]. Moreover, the mutation was identified in patients with cancer diagnoses

other than ACC, including choroid plexus carcinoma, breast cancer and sarcomas [13–15]. Prevalence studies of this germline mutation in different BC cohorts reveals a wide range of carrier frequencies (0.5% to 8.7%) [14–20], which makes further studies essential to understand the real contribution of this mutation to BC risk in the region.

METHODOLOGY

Study participants

The patients included in this study were recruited from the Mastology and Medical Genetics Services of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a public general and university hospital in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil. Patients were recruited and analyzed in two separate groups. Patients of the first group were enrolled between 2002 and 2010 and the only inclusion criteria were a histologically proven diagnosis of breast cancer at or above age 18 years and willingness to participate in the study. At inclusion, patients were not selected regarding family history (FH) of cancer and hence, this group will be described as the “unselected” group or group 1. The second group analyzed included 199 women diagnosed with breast cancer at or below age 45 years, who did not have clinical criteria (Chompret criteria) for *TP53* mutation testing [21]. This group will be described as the “early-onset BC” group or group 2. The 45-year age limit was adopted to stratify groups in relation to age at BC diagnosis, once this cutoff is commonly used in LFS studied and also in clinical criteria that suggest *TP53* mutation (i.e. Chompret criteria) [21].

The study was approved by the institutional ethics committee and all patients provided written informed consent. Demographic, clinical and family history data of the unselected group were obtained by review of medical records.

DNA samples

Genomic DNA was obtained from the leukocyte fraction of peripheral blood, using the Salting-out methodology or the commercial kit Flexigene (Qiagen) [22]. In one of the mutation carriers (unselected group) tumor samples were available and loss

of heterozygosity (LOH) was evaluated in DNA from the breast tumor. To this end, a pathologist prepared and analyzed HE slides containing slices of the tumor sample. Next, a BC region was delimited, microdissected and used for DNA extraction with the commercial kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega).

Genotyping and haplotype analysis

Germline mutation screening and tumor tissue analysis were performed by allelic discrimination using a TaqMan® assay, with customized probes for the wild-type (c.1010G) and mutant (c.1010A) alleles. In all samples with a mutant allele, genotyping was confirmed by Sanger sequencing, as described by Giacomazzi et al. 2014. Assessment of the haplotype associated with the mutant allele was done as described by Garritano et al 2010.

Statistical analysis

The mutation frequency was obtained by simple counting of the number of patients with at least one mutated allele.

RESULTS

Demographic and clinical data

Demographic and clinical data of the unselected group -group 1- are shown in Table 1. Women account for 99.3% of the sample and most (93.5%) were from RS State. Mean age at BC diagnosis was 56.3 years (SD: 13.1 years, range: 28-89 years). Most patients were diagnosed after age 45 years (74.9%). Regarding FH of cancer, 62.2% of the participants reported a positive FH of cancer, considering report of at least one 1st, 2nd or 3rd-degree relative with cancer, without, necessarily, being compatible with a history of predisposition to hereditary cancer syndromes or fulfilling the established clinical criteria for *TP53* mutation testing (Table 1). The most common histological BC type was invasive ductal carcinoma (72.4%).

TP53 p.Arg337His frequency in unselected group was 0.3% (1/315 - 95% CI: 0.01-1.76%), equivalent to that observed in the general population of the Southern and Southeastern regions of Brazil. The carrier was from a small city from the State of São

Paulo, reported Portuguese ancestry, positive family history of cancer and showed the same haplotype previously described as founder [23]. She was diagnosed with an invasive ductal carcinoma of the breast (hormone receptor negative, HER2-positive, overexpressing p53) at age 67 years. Genotyping of tumor tissue did not reveal loss of heterozygosity in the tumor. At age 69 years, the proband was diagnosed with a gastric adenocarcinoma, and died shortly thereafter.

In the second group of patients analyzed, 4 carriers were identified (4/199; 2%, 95% CI: 0.55-5.07%), all with the founder haplotype. Tumors samples were not available for mutation testing and assessment of LOH.

DISCUSSION

By now several studies have provided evidence that the germline *TP53* mutation p.Arg337His is present at an exceedingly high frequency in the general population from Southern and Southeastern Brazil. Although penetrance of this oligomerization domain mutant seems to be decreased in relation to DNA-binding domain mutations, its populational frequency is unsurpassed by any other cancer predisposing germline mutation [9,10,24]. Carrier families have different phenotypes, showing either very few or simplex cancer cases or more complex family histories ranging from phenotypes not clearly suggestive of LFS/LFL to phenotypes typical of these syndromes. In most families in which p.Arg337His is identified, breast cancer diagnosis can be made at different ages [15]. Overall, carriers have a 3.5X higher lifetime risk of developing cancer when compared to non-carriers, and breast cancer is the most frequent tumor diagnosed in adults carriers [9, 24].

The understanding of genetic factors related to BC is essential, because its incidence is increasing worldwide, with varying mortality rates: developed countries tend to present a reduction, while developing countries show increasing rates, a trend also observed in Southern Brazil [25, 26]. In Porto Alegre, the southern city that proportionally shows the highest BC incidence rate among Brazilian capitals, and in the southern state of RS, an important proportion of women is hospitalized or dye from BC before 50 years of age [27, 28]. A population-based study carried out in the city of Porto Alegre with more than 9,000 participants, revealed that 6.2% of women

presented a phenotype compatible with Hereditary Breast Cancer (HBC), and of these, approximately 70% met criteria for LFS or LFL [29]. From these numbers, one could hypothesize that the *TP53* p.Arg337His mutation is important BC risk factor in the region.

In BC, age at diagnosis is an important point to consider. In LFS and LFL, several studies have described a higher mutation prevalence among women with premenopausal when compared to post-menopausal breast cancer and phenotypic criteria that suggest the syndrome (i.e. Chompret criteria) use the age of 45 years as a cutoff age for breast cancer diagnosis [15]. In the current study, we have analyzed two groups of patients. In the unselected group, which was recruited regardless of age at cancer diagnosis and cancer family history, mean age at BC diagnosis (56.3 years), as well as proportion of women diagnosed after 45 years (almost 75%), may have influenced mutation prevalence. We have then examined mutation prevalence in a second group of patients, all diagnosed at or below 45 years and without a family history that would indicate *TP53* mutation testing. In this group, 2% of the women were carriers. In previous studies that included women with a FH compatible with hereditary breast and ovarian cancer syndrome, *TP53* p.Arg337His was identified in 0.94% and 2.5% [19, 20]. On the other hand, a study comprising 390 BC patients – that were not selected regarding FH, revealed a similar prevalence to that seen in the unselected group of our study, 0.5% [18].

When we compared the mutation frequency of our unselected group of patients with previously published mutation frequencies, considering the 95% confidence intervals of these frequencies, 0.3% does not differ significantly from any of these studies except from the studies of Giacomazzi et al. 2013 and Giacomazzi et al 2014. [14,15,24-27]. However, to confirm that the mutation frequency found in this study (unselected group) truly differs from the frequencies observed in the unselected group of Giacomazzi et al 2014, which included patients from the same geographic region, as our study, our sample size of women diagnosed before age 45 is insufficient and this is another significant limitation.

Finally, when we take in account the mutation frequency in the early-onset group, in which the only indication for testing was age at diagnosis, a scenario that has been reported by some authors as indicative for *TP53* p.Arg337His testing in patients

from Southern Brazil [30], mutation prevalence was 2%. Provided that this is the real mutation frequency in women with early-onset breast cancer without a family history, the next question is whether this prevalence justifies routine mutation testing in such cases. In the Ashkenazi Jewish population, where founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations are present in about 2.5% of the individuals, cost-effectiveness studies have implied that population testing is justified [31]. On the other hand, for more complex and admixed populations, where no *BRCA* founder mutations are identified and mutation prevalence is around 0.25%, several authors have stated that population testing is not cost-effective and therefore not justified [32, 33]. In our study, which evaluated *TP53* p.Arg337His carrier frequency among BC affected women from the same institution in Southern Brazil, we have identified different carrier frequencies, depending on age at BC diagnosis and knowledge of FH of cancer (0.3% and 2.0%). Additional studies with larger samples of patients should be undertaken to provide definitive carrier frequencies in different clinical scenarios. Furthermore, a better understand of the penetrance and the cost-effectiveness of *TP53* p.Arg337His testing in women with pre-menopausal breast cancer regardless of family history criteria could contribute to determine if such testing is justified from a public health care perspective.

REFERENCES

1. GLOBOCAN 2012. <http://www.GLOBOCAN.iarc.fr/>. Accessed 10 Oct 2016
2. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, et al (2015) Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny = Menopause Rev* 14:196–202. doi: 10.5114/pm.2015.54346
3. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/>. Accessed 1 Oct 2016
4. Melchor L, Benítez J (2013) The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet* 132:845–863. doi: 10.1007/s00439-013-1299-y
5. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14:359–370. doi: 10.1038/nrc3711
6. IARC *TP53*. <http://p53.iarc.fr/>. Accessed 10 Oct 2016
7. Malkin D (2011) Li-Fraumeni Syndrome. *Genes Cancer* 2:475–484. doi: 10.1177/1947601911413466
8. Lalloo F, Varley J, Ellis D, et al (2003) Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* 361:1101–1102. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12856-5

9. Achatz MI, Zambetti GP (2016) The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. Cold Spring Harb Lab Press. doi: 10.1101/cshperspect.a026195
10. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al (2008) Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 261:21–25. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.044
11. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9330–5. doi: 10.1073/pnas.161479898
12. Achatz MIW, Olivier M, Le Calvez F, et al (2007) The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96–102. doi: 10.1016/j.canlet.2005.12.039
13. Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al (2011) Association of the highly prevalent *TP53* R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil. *Cancer* 117:2228–2235. doi: 10.1002/cncr.25826
14. Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, et al (2013) A *TP53* founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Arch* 463:17–22. doi: 10.1007/s00428-013-1439-8
15. Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CABT, et al (2014) Prevalence of the *TP53* p.R337H Mutation in Breast Cancer Patients in Brazil. *PLoS One* 9:e99893. doi: 10.1371/journal.pone.0099893
16. Gomes MC, Kotsopoulos J, de Almeida GL, et al (2012) The R337H mutation in *TP53* and breast cancer in Brazil. *Hered Cancer Clin Pract* 10:3. doi: 10.1186/1897-4287-10-3
17. Cury NM, Ferraz VE, Silva WA (2014) *TP53* p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hered Cancer Clin Pract* 12:8. doi: 10.1186/1897-4287-12-8
18. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al (2008) Association of the germline *TP53* R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* 8:357. doi: 10.1186/1471-2407-8-357
19. Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, et al (2014) Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet* 15:55. doi: 10.1186/1471-2350-15-55
20. Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, et al (2014) Germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum Genome Var* 1:14012. doi: 10.1038/hgv.2014.12

21. Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, et al (2001) [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. *Bull Cancer* 88:581–7.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
23. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al (2010) Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 31:143–150. doi: 10.1002/humu.21151
24. Gislaine Custódio (2011) Rastreamento da Mutação R337H *TP53*, Diagnóstico Precoce do Tumor de Córtex Adrenal e Histórico de Câncer em Famílias do Estado do Paraná (UFPR).
25. Gonçalves ATC, Jobim PFC, Vanacor R, et al (2007) Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad Saude Publica* 23:1785–1790. doi: 10.1590/S0102-311X2007000800005
26. Sehn L (2012) Análise da Mortalidade por Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Rio Grande do Sul. 14:
27. Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.gov.br/>. Accessed 1 Oct 2016
28. Gross LG, Vianna FSL, Nunes LN, et al (2014) Avaliação epidemiológica da incidência e mortalidade do câncer de mama precoce no Rio Grande do Sul.
29. Palmero EI, Caleffi M, Schüler-Faccini L, et al (2009) Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil. *Genet Mol Biol* 32:447–455. doi: 10.1590/S1415-47572009005000058
30. Andrade KC, Santiago KM, Fortes FP, et al (2016) Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the *TP53* p.R337H mutation. *Genet Mol Biol* 39:199–202. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2014-0343
31. Manchanda R, Legood R, Burnell M, et al (2015) Cost-effectiveness of population screening for BRCA mutations in Ashkenazi jewish women compared with family history-based testing. *J Natl Cancer Inst* 107:380. doi: 10.1093/jnci/dju380
32. Yurgelun MB, Hiller E, Garber JE (2015) Population-Wide Screening for Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations: Too Much of a Good Thing? *J Clin Oncol* 33:3092–5. doi: 10.1200/JCO.2015.60.8596
33. D'Andrea E, Marzuillo C, De Vito C, et al (2016) Which BRCA genetic testing programs are ready for implementation in health care? A systematic review of economic evaluations. *Genet Med* 18:1171–1180. doi: 10.1038/gim.2016.29

Table 1: Demographic and clinical data of the “unselect group” – group 1 (women with breast cancer not selected by age at diagnosis).

	N	%
Gender		
<i>Female</i>	313	99.3
<i>Male</i>	2	0.7
Age at breast cancer diagnosis (years)		
<i>≤45</i>	70	22.2
<i>≥46</i>	236	74.9
<i>Not specified</i>	9	2.9
<i>Mean, SD</i>	56.1, 13.1 years	
Histology		
<i>In situ ductal carcinoma</i>	15	4.8
<i>Invasive ductal carcinoma</i>	228	72.4
<i>In situ lobular carcinoma</i>	2	0.6
<i>Invasive lobular carcinoma</i>	33	10.5
<i>Not specified</i>	37	11.7
Estrogen receptor		
<i>Positive</i>	194	61.6
<i>Negative</i>	72	22.8
<i>Not specified</i>	49	15.6
Progesterone receptor		
<i>Positive</i>	161	51.1
<i>Negative</i>	94	29.8
<i>Not specified</i>	60	19.1
HER2		
<i>Positive</i>	46	14.6
<i>Negative</i>	168	53.3
<i>Not specified</i>	101	32.1
Personal History of additional primary tumors (PH)		
<i>Yes</i>	34	10.8
<i>No</i>	255	81.0
<i>Not specified</i>	26	8.2
PH, cancers		
<i>Breast</i>	14	41.1
<i>Endometrial</i>	9	26.5
<i>Colorectal</i>	2	5.9
<i>Others</i>	9	26.5
Family History of Breast Cancer (FHBC)		
<i>Yes</i>	93	29.5
<i>No</i>	209	66.4
<i>Not specified</i>	13	4.1
FHBC, age of relatives (years)		
<i>≤40</i>	19	20.5
<i>≥41</i>	43	46.2
<i>Not specified</i>	31	33.3
FHBC, affected members		
<i>1 relative</i>	63	67.7
<i>More than 1 relative</i>	30	32.3
Family History of Other Tumors in first degree relative (FHOT)		
<i>Yes</i>	106	33.7
<i>No</i>	187	59.4
<i>Not specified</i>	22	6.9
FHOT, tumors		
<i>Endometrial</i>	17	12.7

<i>Lung</i>	13	9.7
<i>Esophagus</i>	11	8.2
<i>Liver</i>	11	8.2
<i>Colorectal</i>	11	8.2
<i>Prostate</i>	9	6.7
<i>Leukemia</i>	7	5.2
<i>Gastric</i>	7	5.2
<i>Ovary</i>	4	3.0
<i>Other</i>	44	32.9

SD: Standard Deviation

Capítulo V
Artigo Científico II

Mutação germinativa *TP53* p.Arg337His e câncer de mama:
revisão de prevalências no Brasil.

5. Artigo Científico II

Artigo em preparo, formatado segundo normas da ABNT.

Mutação germinativa *TP53* p.Arg337His e câncer de mama: revisão de prevalências no Brasil.

Eriza Cristina Hahn^{1,2,3}, Sandra Leistner-Segal³, Patricia Ashton-Prolla^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

²Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica do HCPA, Porto Alegre, Brazil.

*Autora correspondente

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Departamento de Genética, UFRGS

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90.035-903

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: pprolla@hcpa.edu.br

Tel: +55 513359-8011

RESUMO

A proteína p53 possui papel central no controle adequado do ciclo celular e na manutenção da estabilidade genômica. O gene responsável pela sua codificação, *TP53*, é o que, com maior frequência, apresenta mutações somáticas em diferentes tumores sólidos. Já as mutações germinativas estão associadas às Síndromes de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-*like*, condições que predispoem a múltiplos tumores em idade jovem, como o câncer de mama (CM) pré-menopáusico. No Brasil, portadores de uma mutação germinativa específica, *TP53* p.Arg337His, são observados em uma elevada frequência populacional (cerca de 0,3%), sendo esta alteração já associada a diversos tipos de cânceres, entre eles, o câncer de mama, a manifestação mais frequente em adultos portadores. O objetivo deste estudo é fazer uma revisão de estudos de prevalências de *TP53* p.Arg337His em grupos de pacientes com câncer de mama realizados no Brasil. Para a seleção de estudos, as bases de dados PubMed, LILACs, Medline e SciELO, além de repositórios de dissertações e teses de algumas universidades, foram consultadas. Um total de 7 estudos foi selecionado. Até o momento, mais de 1.500 mulheres com CM foram testadas para esta variante, 91 eram portadoras. As prevalências variaram de 0,5-8,7%, já a média de idade ao diagnóstico de CM nas portadoras foi de, aproximadamente, 41 anos. Além destes, outros aspectos foram analisados em maior detalhe. De maneira geral, pode-se considerar a alta prevalência populacional desta mutação como uma questão de saúde pública, visto o maior risco de desenvolvimento de múltiplos tumores. Especificamente em relação ao CM, esta variante patogênica pode ser um fator que contribui para um grande número de casos, principalmente em regiões com maior concentração da mutação e em mulheres com diagnóstico antes dos 45 anos.

INTRODUÇÃO

Com função central no controle adequado do ciclo celular, a proteína p53 é um fator de transcrição homotetramérico codificado pelo gene *TP53*. Em resposta a condições de estresse celular, como em caso de danos ao DNA, hipóxia, encurtamento telomérico, erros de replicação e sinais hiperproliferativos, p53 é ativada e desencadeia cascatas que participam na manutenção da estabilidade genômica e evitam que células com danos se repliquem de forma descontrolada (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014).

Mutações somáticas em *TP53* são descritas em cerca de 50% dos tumores malignos sólidos, o que torna este gene o mais frequentemente mutado em diferentes tipos de cânceres. Já as mutações germinativas estão amplamente associadas às Síndromes de Li-Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni-*like* (LFL), condições autossômicas dominantes cujo espectro fenotípico inclui predisposição a múltiplos tumores em idade jovem, como o câncer de mama pré-menopáusicos (MALKIN, 2011). Até o momento, 891 variantes germinativas foram descritas neste gene (IARC *TP53*), sendo a maior parte localizada no domínio de ligação ao DNA - cerca de 80% - e que afetam de forma drástica função de fator de transcrição de p53 (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010). Na população em geral, estas variantes herdadas são observadas em baixa frequência (1:2.000-5.000 indivíduos) (LALLOO et al., 2003).

Nas regiões sul e sudeste do Brasil, observa-se uma exceção. Heterozigotos para a variante p.Arg337His, localizada na região que codifica o domínio de oligomerização da proteína p53, éxon 10 do gene *TP53*, foram identificados em uma frequência populacional de cerca de 0,3% (1:300 indivíduos), a maior frequência de portadores já descrita para este gene (PALMERO et al., 2008). É provável que este elevado valor seja, em parte, consequência do efeito fundador já descrito para esta mutação (GARRITANO et al., 2010; PASKULIN et al., 2015; PINTO et al., 2004). Grande parte dos estudos acerca do tema demonstrou a relevância desta mutação para o desenvolvimento do carcinoma adrenocortical (CAC) em crianças, sendo descrita a impressionante prevalência de 97% (35/36) no primeiro estudo que descreveu essa variante no Brasil (CUSTODIO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2001).

O câncer de mama (CM) é a principal causa de morte por câncer em mulheres. No Brasil, é responsável por cerca de 28% dos novos casos relatados anualmente. Estima-se que, destes, pelo menos 10% sejam hereditários, o que significa cerca de 6 mil novos casos ao ano somente no Brasil (INCA). Isto torna interessante o estudo de variantes em genes de predisposição que possam estar associadas ao desenvolvimento destes tumores, como o já citado gene *TP53*.

Um número considerável de estudos envolvendo *TP53* p.Arg337His e câncer de mama já foi realizado no Brasil (CURY; FERRAZ; SILVA, 2014; GIACOMAZZI et al., 2014; SILVA et al., 2014). Ao analisar estes trabalhos, pode-se observar uma ampla variação de prevalências desta mutação. Além disso, já se sabe que o tumor de mama é o tipo mais frequente em adultos portadores desta variante (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; GISLAINE CUSTÓDIO, 2011).

Assim, o objetivo desse artigo é revisar as prevalências de *TP53* p.Arg337His obtidas em pacientes com câncer de mama em estudos realizados no Brasil, bem como analisar criticamente diferentes aspectos abordados nas publicações, com intuito de se compreender a importância desta mutação no contexto do CM.

METODOLOGIA

Revisão de artigos publicados e de trabalhos depositados em bancos de dados de universidades

A seleção de estudos iniciou-se a partir da busca por termos “R337H” e “*TP53* p.Arg337His” nas bases de dados PubMed, LILACs, Medline e SciELO. Além disso, a pesquisa foi realizada em repositórios de dissertações e teses das seguintes universidades: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Universidade de São Paulo (USP) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Em seguida, filtrou-se somente os artigos/arquivos que possuíam como objetivo a estimativa de prevalência da mutação em pacientes com CM e que tivessem sido realizados no Brasil (Figura 1).

RESULTADOS

Seleção de artigos

A busca nas quatro bases de dados resultou em 138 artigos, 66 foram excluídos por se tratarem de repetições. Já a pesquisa em repositórios das universidades resultou em 70 arquivos. No total, 7 estudos de prevalência foram incluídos após aplicação dos critérios de seleção.

Descrição dos estudos de prevalência

Um resumo descritivo dos estudos selecionados está apresentado na Tabela 1. Nesta, dados referentes ao local do estudo, delineamento e amostra, frequência da mutação, idade das portadoras e média de idade da amostra, bem como outros dados relevantes (como história familiar, quando disponível) estão detalhados.

A maioria dos estudos foi realizada nos últimos 5 anos (6/7) e, até o momento, 1.789 pacientes com CM foram testadas para a mutação *TP53* p.Arg337His em estudos de prevalência no Brasil (Tabela 1), o percentual de portadoras foi de 5,1% (91/1.789).

As metodologias mais utilizadas para a testagem foram discriminação alélica por meio de sondas TaqMan® – PCR em tempo real (3/7, GIACOMAZZI et al., 2013, 2014) e Sequenciamento de Sanger (2/7, ASSUMPÇÃO et al., 2008; SILVA et al., 2014), outras metodologias incluíram HRM – *High Resolution Melting* (1/7, CURY; FERRAZ; SILVA, 2014), ARMS-PCR – *Amplification-Refractory Mutation System* (1/7, GOMES et al., 2012) e AS-PCR – *Allele Specific PCR* ou RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (1/7, FELIX et al., 2014). A amostra biológica utilizada com maior frequência para a extração de DNA foi sangue (6/7), e apenas 2 trabalhos analisaram a prevalência da mutação em tecido tumoral (2/7) – Giacomazzi et al 2014 utilizou os dois tipos de amostras, por isso foi incluído nas duas categorias. A análise da perda de heterozigosidade no tecido tumoral foi realizada somente em 2 estudos (ASSUMPÇÃO et al., 2008; GIACOMAZZI et al., 2014a) (os dados deste parágrafo não estão descritos na tabela).

A maior parte dos estudos (5/7) analisou unicamente a mutação p.Arg337His na amostra. Os outros 2, estenderam a avaliação de mutações germinativas para outros genes, como *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*.

O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal invasivo, levando em consideração estudos que fizeram esta caracterização. Apenas um estudo avaliou a prevalência em um tipo específico e raro, tumor *phyllodes* de mama (GIACOMAZZI et al., 2013).

Quanto aos critérios para composição da amostra, os estudos de ASSUMPÇÃO et al. 2008 e de GIACOMAZZI et al. 2014 utilizaram amostragens que incluíram pacientes com CM com e sem HF de câncer. A respeito dos outros cinco trabalhos, 2 não consideraram história familiar compatível com síndromes de predisposição hereditária ao câncer e 3 avaliaram a frequência da mutação em grupos de câncer de mama com HF compatíveis, em sua maioria, com critérios para HBOC.

A idade ao diagnóstico das portadoras de p.Arg337His variou de 19 a 61 anos, sendo a maioria concentrada na faixa etária inferior aos 45 anos (62/91=68%). A média de idade ao diagnóstico das pacientes em geral oscilou entre 43 e 66 anos na maior parte dos estudos. Já entre as portadoras, utilizando os dados disponibilizados, a média foi de 41,15 anos.

O intervalo de confiança a 95%, calculado pelos autores do presente artigo, indica que os intervalos de prevalências são bastante amplos e, portanto, sobrepõem-se, indicando que, com poucas exceções, não diferem entre si (Figura 2).

A localização geográfica dos estudos revela que pacientes de todas as regiões do Brasil já foram testadas para esta mutação, sendo em todas as regiões identificadas portadoras. No entanto, as regiões Sul e Sudeste são as que concentram a maior parte dos estudos e também o maior número de portadoras.

DISCUSSÃO

O entendimento de fatores genéticos relacionados ao câncer de mama é de fundamental importância, pois sua incidência está crescendo em todo o mundo, com países subdesenvolvidos apresentando taxas cada vez maiores de mortalidade devido a esta causa (GLOBOCAN 2012; MARTINS et al., 2013). Como exemplo, o Rio Grande do Sul (RS) é o estado brasileiro com a segunda maior incidência deste

tipo de câncer no Brasil e Porto Alegre, sua capital, é a cidade que, proporcionalmente, diagnostica o maior número de casos de CM, com uma importante parcela de diagnósticos e taxas de mortalidade em mulheres com idade ≤ 50 anos (GONÇALVES et al., 2007; GROSS et al., 2014; SEHN, 2012). Um estudo envolvendo mais de 9.000 mulheres realizado nesta cidade, revelou que 6,2% da amostra apresentava história familiar compatível com Câncer de Mama Hereditário (CMH), sendo cerca de 70% compatível com critérios para a SLF e suas variantes, uma proporção muito acima do esperado. Provavelmente, a elevada prevalência de p.Arg337His nessa região contribua para uma boa parcela destes casos e se constitua em um importante fator de predisposição ao CMH nessa localidade (PALMERO et al., 2009). Isto demonstra a necessidade de estudos futuros para o melhor entendimento da importância desta mutação para o CM, a fim de que estratégias de prevenção e manejo dessas pacientes possam ser adotadas.

Até o momento, mais de 210.000 pessoas foram testadas para a mutação *TP53* p.Arg337His e sua prevalência populacional gira em torno de 0,21-0,30%, o maior valor já descrito para uma única variante germinativa neste gene (CAMINHA, 2015; CUSTODIO et al., 2013; PALMERO et al., 2008). Ao serem comparados com não portadores, heterozigotos para esta mutação possuem um risco 3,5X maior de desenvolvimento de diversos tumores, sendo o câncer de mama o tipo mais frequente em adultos (GISLAINE CUSTÓDIO, 2011).

A grande amplitude de prevalências de *TP53* p.Arg337His em estudos relacionados ao CM deve-se, em parte, a variações nos delineamentos amostrais. Apesar de não serem uniformes, estes estudos contribuem para a obtenção de uma visão geral da importância desta mutação no CM. Em média, a manifestação do CM em portadoras ocorre predominantemente em idade ≤ 45 anos e o diagnóstico tende a ocorrer 8 anos mais tarde em relação a portadoras de mutações clássicas de *TP53* (40 e 32, respectivamente) (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; GIACOMAZZI et al., 2014a). A penetrância reduzida desta mutação pode ser um fator que contribua para este diagnóstico mais tardio.

Apesar de as prevalências variarem de 0,5-8,7%, a maior parte não difere entre si ao se considerar o intervalo de confiança a 95%, medida que sofre influência direta do tamanho amostral utilizado: quanto menor o número de indivíduos

analisados, maior será a amplitude do intervalo obtido. Isto indica que, para obtenção de prevalências mais exatas, é necessária a análise de grupos com tamanho amostral maiores.

No maior estudo acerca do tema, Giacomazzi et al. 2014, amostras recrutadas em três diferentes centros foram avaliadas (Porto Alegre, São Paulo e Barretos). No total, sete valores de prevalência amplamente variáveis (1,9-26,8%) foram obtidos. Ao serem analisadas em separado, essas diferenças de frequências podem indicar a influência direta exercida pela região geográfica, bem como características peculiares a cada centro – como a maior representação de pacientes em maior risco para câncer hereditário - e a importância da idade ao diagnóstico das pacientes, fatores que serão analisados em maior detalhe a seguir.

É importante ressaltar que a maioria dos estudos coletou amostras em grandes centros de referência ou laboratórios especializados na área de câncer hereditário. Esta é uma limitação importante, pois a coleta em locais que agregam pacientes com um perfil compatível com síndromes de câncer hereditário pode superestimar a prevalência da mutação. Além disso, os maiores estudos, e os que apresentaram maior percentual de portadores da mutação, foram executados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, talvez isto seja um indicativo de que a prevalência mais elevada da mutação possa ser consequência da maior amostragem nessas regiões. Para descartar esta possibilidade, é indispensável realizar a expansão das análises para outras regiões brasileiras, com intuito de que uma prevalência nacional confiável possa ser estabelecida. Ou seja, um número adequado de pacientes das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil ainda precisa ser avaliado, pois desta forma será possível entender se a mutação está mais restrita ao Sul e Sudeste ou amplamente difundida ao longo de todo território brasileiro.

Outro aspecto que pode introduzir viés é a variação de delineamentos amostrais. Para a obtenção de prevalências mais informativas, faz-se necessário que as amostras sejam muito bem caracterizadas e que possuam os mesmos delineamentos amostrais. Por exemplo, para se compreender o impacto da mutação em casos de CM em idade jovem e verificar a importância da história familiar de câncer, há que se analisar a prevalência em dois grupos de pacientes distintos: pacientes reconhecidamente sem HF diagnosticadas em idade ≤ 45 anos, pacientes

com HF e diagnóstico ≤ 45 anos. Utilizar como critério apenas “pacientes não selecionadas quanto à HF” pode incluir muitas mulheres com HF positiva e resultar em um viés no sentido de um aumento irreal na prevalência de mutação.

Ao se analisar as metodologias adotadas para a triagem da mutação, o PCR em Tempo Real foi o método mais utilizado. Um estudo comparativo de 3 técnicas usadas para a detecção desta variante - sequenciamento de Sanger, PCR em Tempo Real e HRM, demonstrou que todos são métodos adequados, sendo o HRM o mais barato para a triagem de grandes números de pacientes (FITARELLI-KIEHL et al., 2016).

Quanto ao tipo de amostra biológica utilizada para a extração de DNA, existem indicações de que, para análises mais confiáveis de mutações germinativas, o ideal seria a utilização de tecidos não tumorais. Apesar de p.Arg337His ocorrer em uma frequência extremamente baixa como mutação somática - há somente 3 relatos até o momento (IARC *TP53*), a análise da mutação apenas em tecido tumoral introduz um viés que só pode ser resolvido com a utilização de DNA proveniente de outros tecidos não comprometidos pelo tumor.

O efeito fundador já foi demonstrado para esta mutação por três estudos independentes (GARRITANO et al., 2010; PASKULIN et al., 2015; PINTO et al., 2004), sendo um deles o responsável por indicar como portuguesa a provável origem da mutação (PASKULIN et al., 2015). Este é um dado interessante a ser considerado, pois a alta prevalência na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo, é compatível com a história de colonização desta localidade. No entanto, um estudo de prevalência com mais de 800 mulheres com CM provenientes de Portugal não identificou nenhuma portadora desta mutação (GIACOMAZZI et al., 2014b). Este dado não pode ser encarado como uma evidência de que neste país a mutação não possui relevância, pois o tamanho amostral é insuficiente para esta afirmação, o que torna necessário mais estudos antes de uma conclusão a respeito desta questão.

Por fim, além de análises de prevalência, pacientes com CM portadoras de p.Arg337His também foram utilizadas em estudos com outras abordagens. A revisão de resultados de imunistoquímica (IHQ) de heterozigotas para esta variante, revelou que seu o perfil IHQ parece se assemelhar ao observado em mulheres com câncer de mama em geral: cerca de 20% apresentam HER2 superexpresso, e parece diferir do

perfil apresentado por portadoras de mutações clássicas de *TP53*, que comumente apresentam maiores proporções de HER2 superexpresso, um indicativo de tumores mais agressivos (FITARELLI-KIEHL et al., 2015). Outro estudo recomendou a testagem desta mutação em mulheres com CM em idade jovem (antes dos 45 anos), mesmo que não apresentem critérios para SLF ou suas variantes (ANDRADE et al., 2016).

CONCLUSÃO

De maneira geral, pode-se considerar a alta prevalência populacional desta mutação como uma questão de saúde pública, visto o maior risco de desenvolvimento de múltiplos tumores. Especificamente em relação ao CM, esta variante patogênica pode ser um fator que contribui para um grande número de casos, principalmente em regiões com maior concentração da mutação e em mulheres com diagnóstico antes dos 45 anos. Porém, mais estudos acerca do tema ainda são necessários, a fim de que a contribuição desta mutação para o CM possa ser melhor compreendida.

REFERÊNCIAS

ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2016.

ANDRADE, K. C. et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the *TP53* p.R337H mutation. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 199–202, 24 maio 2016.

ASSUMPÇÃO, J. G. et al. Association of the germline *TP53* R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC cancer**, v. 8, p. 357, 1 dez. 2008.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, 17 abr. 2014.

CAMINHA, I. P. **Prevalência da mutação R337H na região metropolitana de campinas e cidades circunvizinhas**. São Paulo.

CURY, N. M.; FERRAZ, V. E.; SILVA, W. A. *TP53* p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 12, n. 1, p. 8, 13 dez. 2014.

CUSTODIO, G. et al. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the *TP53* R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 20, p. 2619–2626, 10 jul. 2013.

FELIX, G. E. et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and *TP53* in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human Genome Variation**, v. 1, p. 14012, 16 out. 2014.

FITARELLI-KIEHL, M. et al. The breast cancer immunophenotype of *TP53*-p.R337H carriers is different from that observed among other pathogenic *TP53* mutation carriers. **Familial Cancer**, v. 14, n. 2, p. 333–336, 7 jun. 2015.

FITARELLI-KIEHL, M. et al. Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in *TP53*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 203–209, jun. 2016.

GARRITANO, S. et al. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 143–150, fev. 2010.

GIACOMAZZI, J. et al. A *TP53* founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. **Virchows Archiv**, v. 463, n. 1, p. 17–22, 21 jul. 2013.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the *TP53* p.R337H Mutation in Breast Cancer Patients in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99893, 17 jun. 2014a.

GIACOMAZZI, J. et al. The Brazilian Founder Mutation *TP53* p.R337H is Uncommon in Portuguese Women Diagnosed with Breast Cancer. **The Breast Journal**, v. 20, n. 5, p. 534–536, set. 2014b.

GISLAINE CUSTÓDIO. Rastreamento da Mutação R337H *TP53*, Diagnóstico Precoce do Tumor de Córtex Adrenal e Histórico de Câncer em Famílias do Estado do Paraná. 2011.

GLOBOCAN 2012. Disponível em: <<http://www.GLOBOCAN.iarc.fr/>>. Acesso em: 20 out. 2016.

GOMES, M. C. et al. The R337H mutation in *TP53* and breast cancer in Brazil. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 10, n. 1, p. 3, 28 dez. 2012.

GONÇALVES, A. T. C. et al. Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p. 1785–1790, ago. 2007.

GROSS, L. G. et al. **Avaliação epidemiológica da incidência e mortalidade do câncer de mama precoce no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/>>. Acesso em: 10 fev. 2017

IARC TP53. Disponível em: <<http://p53.iarc.fr/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 1 out. 2016.

LALLOO, F. et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. **The Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1101–1102, 29 mar. 2003.

MALKIN, D. Li-Fraumeni Syndrome. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 4, p. 475–484, 1 abr. 2011.

MARTINS, C. A. et al. Evolução da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Desafios para uma Política de Atenção Oncológica. **Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 341–349, 2013.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. *TP53* Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001008–a001008, 1 jan. 2010.

PALMERO, E. I. et al. Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Letters**, v. 261, n. 1, p. 21–25, 8 mar. 2008.

PALMERO, E. I. et al. Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 447–455, 2009.

PASKULIN, D. D. et al. Ancestry of the Brazilian *TP53* c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143262, 30 nov. 2015.

PINTO, E. M. et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 5, p. 647–650, 2004.

RIBEIRO, R. C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9330–5, 31 jul. 2001.

SEHN, L. Análise da Mortalidade por Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Rio Grande do Sul. v. 14, n. 1, 2012.

SILVA, F. C. et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Medical Genetics**, v. 15, n. 1, p. 55, 15 dez. 2014.

Em andamento:

- Confecção de um mapa de todas as pacientes testadas, com destaque para as portadoras já identificadas.

FIGURAS E TABELAS

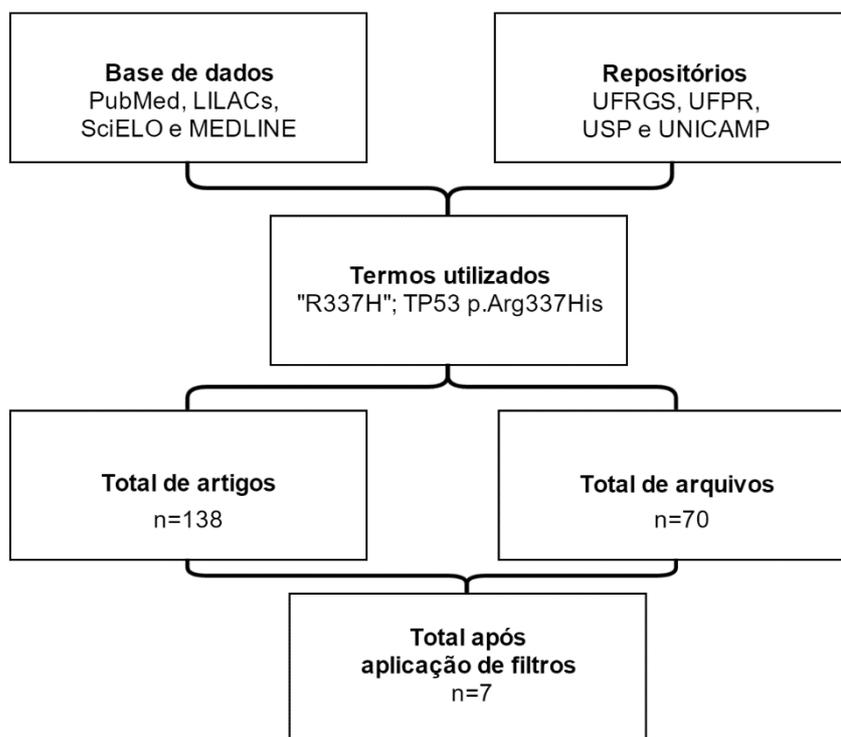


Figura 1: Fluxograma demonstrando os passos que levaram à seleção de estudos utilizados nesta revisão.

Tabela 1: Resumo descritivo dos aspectos mais relevantes de estudos de prevalência da mutação TP53 p.Arg337His em diferentes grupos de pacientes com câncer de mama.

Referência	Estado	Delineamento/Amostra	Frequência de TP53 p.Arg337His (IC 95% mín-máx%)	Média de idade ao diagnóstico da amostra (DP ou mín-máx, anos)	Idade das portadoras e HF ou outros tumores	Outros dados interessantes
1. Assumpção et al 2008	SP	Caso-Controlle - Casos CM (n=123), sendo, quanto à HF, 78 negativos e 45 positivos – previamente testadas para mutações em BRCA1,2 - Controles (n=223) pareadas quanto à idade	2,4% (0.51-6.96%) Portadoras: - 3/123 no grupo de casos - Nenhum relato em controles	NI	1: 19a (Sem HF) 2: 29a (com HF: talvez LFL; segundo câncer - cérebro) 3: 44a (com HF: Birch's criteria)	Quanto à perda de heterozigidade no tumor de mama: as três portadoras apresentaram manutenção somente do alelo não mutado. A mutação está associada ao CM na região Sudeste do Brasil.
2. Gomes et al 2012	RJ	Caso-Controlle - Casos CM invasivo (n=390) não selecionados quanto à HF - Controles (n=324)	0,5% (0.06-1,84%) Portadoras: - 2/390 no grupo de casos - Nenhum relato em controles	- Casos: 46a (25-66a) - Controles: 40ª (19-63a)	1: 35a (com HF) 2: 39a (com HF)	
3. Giacomazzi et al 2013	RS SP	Estudo observacional Tumor <i>phyllodes</i> de mama: - 128 casos benignos - 7 casos <i>borderline</i> - 13 casos malignos	5.4 % (2.36-10.37%) A mutação foi encontrada em 8 tumores: - Benigno: 3,9% (5/128) - Borderline: zero - Maligno: 23% (3/13)	- Benigno: 39a (16–81) - Borderline: 52a (41–71) - Maligno: 57a (28–80)	Média de idade das portadoras (DP) - Benigno: 32.6a (7.7a) - Maligno: 54.6a (7.7a)	
4. Felix et al 2014	BA	Estudo observacional 106 pacientes não relacionados com alto risco para HBOC	0.94% (0.02-5.14%) Portadora: 1/106	43,1a (10.67a)	1: 53a (tia materna com CM)	91,4% possuíam câncer de mama; o restante, câncer de ovário.
5. Cury et al 2014	SP	Caso-Controlle - Casos CM (n=28), com critério para HBOC - Controles (120), pareadas quanto à idade	7.1% (0.88-23.5%) Portadoras: - 2/28 no grupo casos - Nenhum relato em controles	41,75a (10.25a)	As duas portadoras não apresentavam critérios para SLF nem LFL	Pacientes sem critérios para SLF ou LFL também apresentam a mutação.

					1: câncer de parótida 60a, câncer de mama bilateral (61a ,62a) 2: 30a
6. Silva et al 2014	SP	Estudo Observacional	2,5% (0.52-7.13%) Portadoras: 3/120 (Outras mutações: BRCA1 - 26%. BRCA2 - 5,83%)	43a (22-88)	1: 49a 2: 49a 3: 39a
		120 pacientes não relacionadas com critérios para HBOC			
7. Giacomazzi et al 2014	RS SP	Estudo Observacional	<u>Grupo 1</u> 3,4% (0.41-11.71%) Portadoras: 2/59 <u>Grupo 2</u> 8,6% (6,76-10,73%) Portadoras: 70/815 Detalhamento ≤45 anos - 49/403: 12,1% (9.13-15.75%) ≥ 55 anos – 21/412: 5,1% (3.18-7.69%)	Grupo 1 43a (11.9a) Grupo 2 ≤45 anos 38a (5a) ≥ 55 anos 66a (9a)	A mutação foi observada em todos os grupos. A maior frequência foi em pacientes com diagnóstico em idade ≤ 45 anos.

Legenda

Estados: BA – Bahia; SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; RS: Rio Grande do Sul.

Outras: CM – Câncer de Mama; CMH – Câncer de Mama Hereditário; HBOC - *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*; HF: História Familiar para câncer; NI – Não Informado; SLF - Síndrome de Li-Fraumeni; LFL - Síndrome de Li-Fraumeni-like.

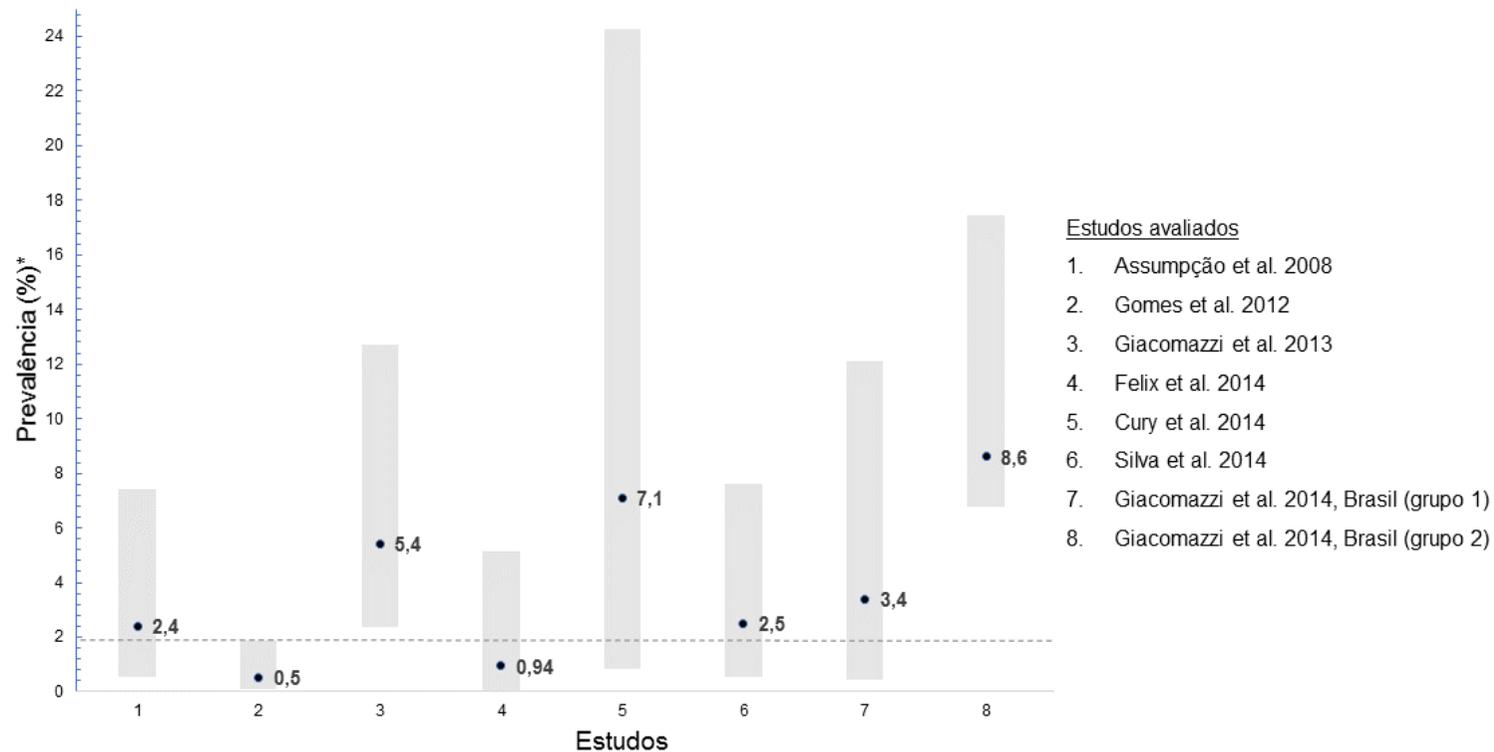


Figura 2. Gráfico de prevalências da mutação *TP53* p.Arg337His em diferentes estudos envolvendo pacientes com câncer de mama. O ponto indica a prevalência exata obtida, já a barra em cinza, os valores correspondentes ao intervalo de confiança a 95% (exato de Fisher). A linha pontilhada serve como base de comparação entre os valores. (OBS: Os delineamentos amostrais não foram uniformes, para mais detalhes, ver Tabela 1). * Prevalência de indivíduos com pelo menos um alelo mutado.

Capítulo VI
Discussão

6. DISCUSSÃO

OBSERVAÇÕES: Neste capítulo serão discutidos aspectos ainda não abordados na profundidade adequada durante as discussões dos artigos científicos (capítulos IV e V). Como forma de simplificação, o termo R337H será utilizado como sinônimo de TP53 p.Arg337His. Os Intervalos de Confiança foram calculados pela autora, com auxílio do programa estatístico WinPepi (Valor utilizado: IC 95% Exato de Fisher).

A variante germinativa R337H possui a maior frequência populacional já descrita para mutações herdadas no gene *TP53*. Além do primeiro valor estabelecido em 0,3% - IC 95% 0,03-0,96% (PALMERO et al., 2008), dois outros grandes estudos realizados no Brasil revelaram prevalências semelhantes: 0,27% - IC 95% 0,25-0,30%, após a testagem de 171.649 recém-nascidos (RN) no estado do Paraná (GISLAINE CUSTÓDIO, 2011), e 0,21% - IC 95% 0,16-0,26%, em um estudo que testou 32.130 RN provenientes da região metropolitana de Campinas e de cidades circunvizinhas, no estado de São Paulo (CAMINHA, 2015). Até o momento, mais de 200.000 pessoas foram testadas e, no geral, a prevalência estimada gira em torno de 1/375 (0,27%) nas regiões Sul e Sudeste (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016). Além disso, outro trabalho em escala populacional foi realizado no Paraguai (LEGAL et al., 2015). Utilizando amostras de papel filtro de 10.000 RN provenientes de regiões vizinhas ao Brasil, 5 indivíduos foram positivos para a mutação (uma prevalência 0,05%, IC 95% 0,016-0,117%).

Uma hipótese para a manutenção da elevada frequência de R337H tem como argumento o baixo impacto desta mutação em tumores de infância – exemplo: penetrância de 1:30-40 de CAC em crianças portadoras (CUSTODIO et al., 2013), permitindo que indivíduos cheguem até a idade de reprodução e a transmitam para a prole. Esta é uma ideia interessante se o risco cumulativo de câncer associado a essa mutação for considerado: somente 15-20% dos portadores desenvolvem câncer antes dos 30 anos, em comparação a 50% dos portadores de mutações clássicas (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; GARRITANO et al., 2010).

A alta frequência populacional desta mutação abre questões que concernem a sua patogenicidade. Ao longo dos próximos parágrafos serão discutidos aspectos relacionados a este tema, com intuito de analisar o maior número de

achados que possam fornecer evidências, em diferentes níveis, de sua patogenicidade.

Macro evidências: associação com tumores malignos e comparação com bancos de dados

Apesar de sabidamente possuir uma penetrância reduzida em relação às mutações clássicas de *TP53*, a mutação p.Arg337His já foi associada a diversos tipos de tumores e está relacionada a um número maior de casos de câncer em famílias portadoras. Como exemplo, a análise de 353 famílias portadoras no estado do Paraná demonstrou uma taxa 3,5X maior de tumores malignos em comparação a famílias em que a mutação não segregava, sendo os tumores de mama e estômago os mais frequentes em portadores adultos (a ocorrência dos dois tipos aconteceu em 29,6% das famílias) e o CAC o tumor infantil mais frequente, observado em maior frequência do que em portadores de mutações clássicas (GISLAINE CUSTÓDIO, 2011).

Ao comparar esta frequência populacional com a encontrada em bancos de dados públicos que agregam resultados de exomas, pode-se perceber uma prevalência extremamente baixa, como a disponível no ExAC, *Exome Aggregation Consortium* - $1/117390 = 8,5 \times 10^{-6}$, ou até mesmo nula, como os bancos ESP – *Exome Sequencing Project*, 1000 genomas e ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações.

O banco de dados ExAC compila mais de 60.000 exomas, sendo a maioria indivíduos de origem europeia - mais de 50%, porém o único relato em heterozigose foi em um indivíduo latino (a amostra latina corresponde a cerca de 10% do total). Já as fontes ESP e 1000 genomas, nas quais não houve nenhuma ocorrência da mutação, possuem pouca ou nenhuma contribuição de pessoas latinas (LEK et al., 2016). Estes resultados parecem ir de encontro ao fato de a mutação ter se originado por efeito fundador e possuir frequência elevada somente em localidades específicas, como em determinadas regiões do Brasil (GARRITANO et al., 2010).

Por fim, a frequência nula da mutação em exomas de 609 idosos coletados na cidade de São Paulo (ABraOM) parece ser um dado intrigante, visto que a mutação possui uma frequência populacional de 0,27% nesta região. No entanto, não são destacadas informações sobre a naturalidade desses indivíduos e o

tamanho de amostra é pequeno, fatores que podem ser chave para a não observação da mutação.

Evidências moleculares: hipóteses acerca do seu efeito sobre a atividade de p53

Normalmente genes supressores tumorais, como *BRCA1* e *BRCA2*, são inativados por mutações de mudança no quadro de leitura ou de perda de sentido que levam a uma proteína truncada ou até mesmo ausência de expressão. Já em *TP53*, 80% das mutações são de ponto, do tipo substituição, o que indica que a proteína é traduzida em toda sua extensão e sem grandes alterações de sequência. No entanto, isto não implica em proteínas p53 funcionais, pois, com frequência, estas mutações acarretam alterações estruturais que inativam sua função e levam ao seu acúmulo na célula (IARC *TP53*).

Proteínas p53 mutantes podem contribuir para a carcinogênese de diversas maneiras. Dentre os mecanismos já descritos, tem-se: ligação de proteínas mutantes ao DNA e consequente alteração de padrões de expressão gênica; ligação a fatores de transcrição específicos, podendo tanto reforçar quanto diminuir sua função; interação direta com outras proteínas e alteração de suas funções (MULLER; VOUSDEN, 2013).

Por muito tempo, mutações no domínio de ligação (DL) ao DNA foram o foco das atenções, isto introduziu um viés de análise e fez com que muitos estudos investigassem somente este domínio em pacientes candidatos à testagem molecular de *TP53* (SOUSSE; DEHOUCHE; BÈROUD, 2000). Apesar de ainda ser considerado o *hotspot* de mutações, ao se fazer uma análise da distribuição das alterações ao longo do gene, pode-se perceber que a proporção de mutações neste domínio é muito semelhante a observada no domínio de oligomerização (DO): 80% dos pacientes apresentam mutações ao longo dos quase 600 nucleotídeos (nt) correspondentes ao DL e 17% as possuem em uma extensão de cerca de 90 nt do DO (KAMADA et al., 2011).

Assim, com o passar do tempo, a importância de se analisar outras regiões do gene, como o DO, ficou evidente. Um exemplo: todas as novas mutações reportadas no ano de 2012 em um banco de dados de mutações em *TP53* (<http://p53.fr>), se localizavam fora do domínio de ligação ao DNA (LEROY et al., 2013).

O domínio de oligomerização de p53 é composto por duas estruturas secundárias distintas: folhas beta (resíduos 326-333), uma alça (334) e alfa hélice (335-356). Até o momento, 376 variantes somáticas e germinativas foram descritas nesta região e 52 foram classificadas como patogênicas por diferentes preditores de patogenicidade, como SIFT, Polyphen e AGVGD (IARC *TP53*). Mutações que afetam resíduos de aminoácidos na região da alfa hélice, R337H está localizada no início desta sequência, parecem ter impacto maior sobre o processo de oligomerização, isto porque estas variantes tendem a afetar o equilíbrio entre monômeros e tetrâmeros de p53 disponíveis na célula, além de os tetrâmeros, quando e se formados, não apresentarem a mesma estabilidade do que proteínas não mutadas (KAMADA et al., 2011).

Desde janeiro de 2016, o banco de dados de variantes com importância clínica do NCBI – ClinVar – considera que já existem evidências suficientes para caracterizar esta mutação como patogênica, já a base de dados que agrega mutações germinativas e somáticas de *TP53*, IARC, a considera como deletéria, porém, parcialmente funcional. Contudo, o mecanismo pelo qual R337H contribui para a carcinogênese ainda não é completamente compreendido. Poucos estudos foram realizados nesta área, mas já existem algumas evidências de que a mutação possui impacto em processos relacionados ao estresse oxidativo (MACEDO et al., 2012) e que afeta a formação de tetrâmeros funcionais de uma maneira dependente de pH, sendo a estrutura de p53 desestabilizada em pH levemente alcalino (DIGIAMMARINO et al., 2002).

Além da troca de uma arginina por uma histidina, 3 outras possibilidades de substituições já foram descritas no códon 337: prolina, cisteína e lisina, sendo todas consideradas como não funcionais e patogênicas, com ocorrência, na maioria das vezes, como variantes somáticas. Uma hipótese a respeito do efeito menos pronunciado de R337H poderia considerar que os aminoácidos envolvidos, arginina e histidina, são de uma mesma classe química, ambos básicos, e que, teoricamente, esta substituição não afetaria de forma tão pronunciada a estrutura de p53.

No entanto, a histidina apresenta uma propriedade única em relação a outros aminoácidos: sensibilidade elevada a pequenas alterações de pH devido à presença de um anel imidazólico em sua estrutura, o que permite a sua atuação tanto como aceptor ou doador de prótons e evidencia a flexibilidade que

a presença deste aminoácido traz à estrutura da proteína (KULIS-HORN; PERSICKE; KALINOWSKI, 2014; NELSON & COX, 2009). Esta característica exclusiva faz com que este aminoácido não possa ser substituído por nenhum outro sem que isso ocasione mudanças estruturais (BETTS; RUSSELL, 2003) e reflete o fato de apenas 3% das proteínas o apresentarem em sua sequência geralmente, em regiões de sítios ativos.

No domínio de oligomerização não mutado de p53, nenhuma histidina é encontrada ao longo dos 30 resíduos de aminoácidos que o compõe. Interessante de se ressaltar é o fato de que duas das mutações mais frequentes de *TP53*, observadas no domínio de ligação, tanto como somáticas quanto como germinativas, constituem-se exatamente na mesma troca: p.Arg175His e p.Arg273His (figura 5, página 11), ambas com efeito drástico sobre a capacidade de p53 se ligar ao DNA e exercer seu papel de fator de transcrição (IARC *TP53*; PETITJEAN et al., 2007). Seria este tipo de substituição uma assinatura genômica importante em relação a mutações no gene *TP53* e câncer?

Já se sabe que o interior de células tumorais apresenta um gradiente de pH reverso em relação a células saudáveis, e, por este motivo, costuma ser mais básico, sendo a matriz extracelular mantida ácida por uma série de mecanismos decorrentes de alterações metabólicas que bombeiam ativamente H⁺ para o exterior da célula (SWIETACH et al., 2014; WEBB et al., 2011). Em condições de exposição prolongada a um meio extracelular ácido, um aumento de danos ao DNA pode ser observado, o que, normalmente, faz com que as células necrosem ou sejam encaminhadas para apoptose por vias que envolvem p53 e caspases (GATENBY; GILLIES, 2004). Em casos de proteínas p53 mutadas, esta via estaria parcialmente prejudicada, o que poderia contribuir para a manutenção de células que deveriam ser eliminadas.

Com base nestas informações, duas hipóteses não excludentes de como R337H pode contribuir para a carcinogênese podem ser formuladas:

- Primeira: R337H contribui para a progressão tumoral.

Pode se pensar que R337H não tenha papel tão decisivo em processos iniciais de estabelecimento do tumor. A combinação de outros fatores genéticos, como variantes de predisposição em outros genes ou fatores que modifiquem a penetrância desta mutação, como

polimorfismos intragênicos de *TP53*, contribuiriam para o surgimento do tumor. Ao se estabelecer, as células neoplásicas gradativamente apresentariam pH mais básico, o que afetaria de forma mais drástica a atividade normal de p53-R337H e poderia contribuir para a progressão tumoral.

- Segunda: R337H contribui tanto para o estabelecimento quanto para a progressão tumoral.

Em condições normais, a mutação não exerceria impacto tão drástico sobre a função de p53 e permitiria a formação de heterotretâmeros, combinações de monômeros de p53 mutados e não mutados, ainda parcialmente funcionais. Porém, a longo prazo, a função apenas parcial destas proteínas poderia ter reflexo na manutenção da estabilidade genômica e do metabolismo energético. O que de forma mais lenta, poderia contribuir para o acúmulo de alterações deletérias, fator que gradativamente tornaria a célula mais suscetível à malignização (e tornaria o pH intracelular mais básico, situação que afetaria de forma mais drástica a função de p53-R337H, contribuindo para a progressão e agressividade tumoral).

Uma outra forma de analisar a patogenicidade desta mutação é sob a perspectiva da perda de heteroziguidade no tecido tumoral. No CAC, comumente é observada a perda de heteroziguidade por deleção do alelo selvagem e a manutenção apenas do alelo mutado R337H. Neste caso, o mecanismo pelo qual a mutação age seria o de “perda de função”, modelo proposto por Knudson, que diz que a perda de função está relacionada a mutações deletérias em ambos os alelos (KNUDSON, 2001). Porém, em diversos casos, inclusive envolvendo outras mutações germinativas de *TP53*, constata-se a manutenção dos dois alelos, selvagem e mutado, evento observado no presente estudo. Isto não deve descartar a importância destas mutações para a carcinogênese. Antes, é necessário considerar que a perda de função pode apenas não ser melhor modelo para se explicar estes casos, o que evidencia a importância de uma análise mais profunda para entender o mecanismo que melhor se encaixa nestas situações.

Uma explicação plausível seria a de que R337H exerça efeito dominante negativo sobre a proteína não mutada, interferindo diretamente em sua função, principalmente no que diz respeito à formação de tetrâmeros funcionais. Esta ideia pode ser reforçada com a constatação de que homozigotos para R337H não apresentam fenótipo mais afetado do que heterozigotos. Para algumas mutações no DO de p53, já foi descrito, ainda, uma terceira hipótese: um efeito dominante *prion-like*. Três domínios de p53 apresentam a capacidade de formar agregados semelhantes a estruturas amiloides, algumas mutações podem favorecer esta formação e auxiliar na oncogênese através de ganho de funções de proteínas p53 mutantes (e interferência nas proteínas selvagens remanescentes), o que se assemelharia ao observado em doenças priônicas. Esse mecanismo foi proposto, por exemplo, para a mutação p.Gly334Val no câncer de pulmão (HIGASHIMOTO et al., 2006).

Além disso, sabe-se que o nível intracelular de p53 é regulado principalmente pela proteína ubiquitina-ligase Mdm2 (Murine double minute 2), que se liga à p53 e a encaminha para degradação em proteossomos (SCHON et al., 2002). A inibição da ubiquitinação também é um dos mecanismos propostos para explicar como mutações no DO de p53 podem contribuir para a carcinogênese. Através de simulações de dinâmica molecular, foi demonstrado que mutações no códon 330 afetam de forma direta a ubiquitinação e contribuem para o acúmulo de p53 mutantes no interior das células (LANG et al., 2014).

Milhares de mutações somáticas foram descritas em *TP53*, sendo a maior parte do tipo transição G>A em sítios CpG. O fato de R337H provavelmente ter se originado por deaminação espontânea em um sítio propenso a este tipo de mutação, torna interessante a sua baixa prevalência como mutação somática em tumores esporádicos: somente três casos foram descritos até o momento (IARC *TP53*). Além disso, a sua elevada chance de ocorrer em eventos independentes, torna impressionante o fato de todos, com exceção de um portador na Alemanha (HERRMANN et al., 2012), possuírem exatamente o mesmo haplótipo fundador descrito por Garritano et al 2010, que possui provável origem datada há aproximadamente 2000 anos, em um indivíduo com naturalidade portuguesa (PASKULIN et al., 2015).

Outras questões acerca do tema ainda sem resposta

1. Por que os tumores da SLF são mais frequentes em mulheres (Figura 6, página 12)? Mutações em *TP53* apresentam alguma resposta diferencial em relação aos hormônios femininos?
2. A disponibilidade de histidina na célula é a mesma de arginina? Se este aminoácido está presente em somente em 3% das proteínas, e ainda restrito a sítios ativos, teria uma disponibilidade menor que retardaria a formação de peptídeos de p53? Resumindo: caso a histidina seja menos disponível, isto poderia afetar a velocidade com a qual a proteína é sintetizada e ser um fator que contribui para a carcinogênese?
3. A criação de sítios de *splicing* ou a geração de novas isoformas devido a esta mutação já foi descartada? Apesar de ser pouco provável, seria interessante analisar cDNA de pacientes portadores de R337H.
4. Existem diversas isoformas de p53: tecido específicas e com níveis de expressão diferenciados. Pode haver favorecimento de isoformas com atividade mais prejudicada em tecidos específicos (exemplo: mama e estômago, os dois sítios de tumores mais frequentes em portadores)?

Considerações finais

A não utilização de critérios mais específicos para a composição do grupo de pacientes com câncer de mama analisado neste estudo, como história familiar compatível com síndromes de predisposição hereditárias e idade ao diagnóstico de CM inferior aos 45 anos, se deve ao fato de esta ser uma amostra de conveniência, estabelecida anteriormente ao início do estudo.

Assim, características como idade ao diagnóstico de CM não puderam ser controladas e mais de 70% da amostra apresentou diagnóstico após os 45 anos, uma idade considerada crítica para indivíduos com SLF. No entanto, a realização de estudos de prevalência em grupos de pacientes com câncer de mama que apresentam diferentes perfis demográficos e clínicos também possuem importância, pois auxiliam em um entendimento mais amplo da ocorrência desta mutação em diferentes contextos relacionados ao câncer de mama.

O contato com familiares da única portadora foi realizado, a fim de colocar à disposição consultas de aconselhamento genético para explicação de riscos associados à ocorrência da mutação para familiares, bem como medidas preventivas e de manejo que podem ser adotadas. No entanto, até o momento, o familiar contatado disse não possuir interesse no assunto.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, a mutação germinativa *TP53* p.Arg337His foi observada em uma prevalência semelhante à frequência populacional na mesma região (Sul do Brasil). Este resultado deve ser analisado com cuidado, pois apenas uma pequena parcela da amostra foi diagnosticada com CM em idade ≤ 45 anos, grupo em que a prevalência da mutação é maior. Para entender o real impacto desta variante para casos de câncer de mama nesta região, ainda se faz necessária a análise de um grupo maior de pacientes com CM em idade jovem.

8. PERSPECTIVAS

1. Aumentar o número de pacientes com câncer de mama em idade jovem (antes dos 45 anos), uma vez que somente cerca de 20% da amostra é constituída por pacientes com esse perfil e que, neste grupo, a prevalência de *TP53* p.Arg337His é maior.
2. Estender a amostragem de pacientes com câncer de mama para as outras regiões do Brasil, com intuito de analisar se a mutação é mais frequente nas regiões Sul e Sudeste ou se apresenta uma distribuição homogênea no território nacional.
3. Investigar a relação entre a mutação *TP53* p.Arg337His e o desenvolvimento dos tumores malignos de mama e estômago, os dois tipos mais frequentes entre portadores adultos. Estes órgãos apresentam condições específicas que favorecem a tumorigênese na presença da mutação?

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHATZ, M. I. A. D. S.; BERNTANI, R. R. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53** Tes. [s.l: s.n.].

ACHATZ, M. I. W. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer letters**, v. 245, n. 1–2, p. 96–102, 8 jan. 2007.

ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2016.

AKOUCHEKIAN, M. et al. Does PTEN gene mutation play any role in Li-Fraumeni syndrome. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 30, p. 378, 2016.

ACS, **American Cancer Society**. Disponível em <http://www.cancer.org/>. Acesso em: 20 out. 2016.

ACS², **American Cancer Society** - Breast Cancer, Facts and Figures 2015-2016. Disponível em <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2016/>. Acesso em: 20 out. 2016.

ANDERS, C. K. et al. Breast cancer before age 40 years. **Seminars in oncology**, v. 36, n. 3, p. 237–49, jun. 2009.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 747318, 2013.

ASHTON-PROLLA, P. et al. Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 283, 14 dez. 2009.

ASHTON-PROLLA, P. et al. The Brazilian Hereditary Cancer Network: historical aspects and challenges for clinical cancer genetics in the public health care system in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 163–165, jun. 2016.

BENSAAD, K.; VOUSDEN, K. H. p53: new roles in metabolism. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 286–291, jun. 2007.

BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: **Bioinformatics for Geneticists**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2003. p. 289–316.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, 17 abr. 2014.

BOUAOUN, L. et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. **Human Mutation**, v. 37, n. 9, p. 865–876, set. 2016.

BROWN, S. B.; HANKINSON, S. E. Endogenous estrogens and the risk of breast,

endometrial, and ovarian cancers. **Steroids**, v. 99, n. Pt A, p. 8–10, jul. 2015.

CAMINHA, I. P. **Prevalência da mutação R337H na região metropolitana de campinas e cidades circunvizinhas**. São Paulo, 2015 (UNICAMP).

CHÈNE, P. The role of tetramerization in p53 function. **Oncogene**, v. 393, n. 21, p. 2611–2617, 2001.

CORNEJO-MORENO, B. A.; URIBE-ESCAMILLA, D.; SALAMANCA-GÓMEZ, F. Breast cancer genes: looking for BRACA's lost brother. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 16, n. 12, p. 787–92, dez. 2014.

CUSTODIO, G. et al. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the *TP53* R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 20, p. 2619–2626, 10 jul. 2013.

CYBULSKI, C. et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 28, p. 3747–52, 1 out. 2011.

DIGIAMMARINO, E. L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 12–16, 1 jan. 2002.

ENSEMBL, estrutura do gene *TP53*. Disponível em <http://www.ensembl.org/>. Acesso em: 15 jul. 2016.

EVANS-KNOWELL, A.; LARUE, A.; FINDLAY, V. J. MicroRNAs and Their Impact on Breast Cancer, the Tumor Microenvironment, and Disparities. In: **Cancer Disparities**. [s.l.: s.n.]. p. 51–76.

FERRINI, K. et al. Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. **Ecancermedicalscience**, v. 9, p. 557, 2015.

FRIEDMAN, P. N. et al. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3319–23, 15 abr. 1993.

GARRITANO, S. et al. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 143–150, fev. 2010.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891–899, nov. 2004.

GISLAINE CUSTÓDIO. Rastreamento da Mutação R337H *TP53*, Diagnóstico Precoce do Tumor de Córtex Adrenal e Histórico de Câncer em Famílias do Estado do Paraná. 2011 (UFPR).

GLOBOCAN 2012, Cancer Today - Dados epidemiológicos de Câncer no mundo. Disponível em <http://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 10 out. 2016.

GROSS, L. G. et al. **Avaliação epidemiológica da incidência e mortalidade do câncer de mama precoce no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/>>. Acesso em: 10 fev. 2017

HAINAUT, P. Tumor-specific mutations in p53: The acid test. **Nature Medicine**, v. 8, n. 1, p. 21–23, 1 jan. 2002.

HERRMANN, L. J. M. et al. *TP53* Germline Mutations in Adult Patients with Adrenocortical Carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 3, p. E476–E485, mar. 2012.

HIGASHIMOTO, Y. et al. Unfolding, Aggregation, and Amyloid Formation by the Tetramerization Domain from Mutant p53 Associated with Lung Cancer †. **Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1608–1619, 14 fev. 2006.

INCA, 2016. **Instituto Nacional do Câncer**. Dados epidemiológicos de câncer no Brasil e no Rio Grande do Sul. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em: 10 out. 2016.

KAMADA, R. et al. Cancer-associated p53 Tetramerization Domain Mutants: QUANTITATIVE ANALYSIS REVEALS A LOW THRESHOLD FOR TUMOR SUPPRESSOR INACTIVATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 252–258, 7 jan. 2011.

KNUDSON, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Review Cancer**, v. 1, n.2, p.157-162, nov. 2001.

KULIS-HORN, R. K.; PERSICKE, M.; KALINOWSKI, J. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 5–25, jan. 2014.

LANG, V. et al. Tetramerization-defects of p53 result in aberrant ubiquitylation and transcriptional activity. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 5, p. 1026–1042, jul. 2014.

LARSEN, M. J. et al. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast cancer : basic and clinical research**, v. 8, p. 145–55, 2014.

LEGAL, E. F. et al. Prevalence of an inherited cancer predisposition syndrome associated with the germ line *TP53* R337H mutation in Paraguay. **Cancer Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 166–169, abr. 2015.

LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, 2016.

LEROY, B. et al. The *TP53* website: an integrative resource centre for the *TP53* mutation database and *TP53* mutant analysis. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D962-9, jan. 2013.

LWIN, T. Z.; DURANT, J. J.; BASHFORD, D. A fluid salt-bridging cluster and the stabilization of p53. **Journal of molecular biology**, v. 373, n. 5, p. 1334–47, 9 nov. 2007.

MACEDO, G. S. et al. Increased Oxidative Damage in Carriers of the Germline *TP53* p.R337H Mutation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47010, 9 out. 2012.

MAGNÉ, N. et al. Recommendations for a lifestyle which could prevent breast cancer and its relapse: Physical activity and dietetic aspects. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 3, p. 450–459, dez. 2011.

- MALKIN, D. Li-Fraumeni Syndrome. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 4, p. 475–484, 1 abr. 2011.
- MANTOVANI, F.; WALERYCH, D.; SAL, G. DEL. Targeting mutant p53 in cancer: a long road to precision therapy. **The FEBS Journal**, nov. 2016.
- MARTINS, C. A. et al. Evolução da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Desafios para uma Política de Atenção Oncológica. **Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 341–349, 2013.
- MELCHOR, L.; BENÍTEZ, J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. **Human Genetics**, v. 132, n. 8, p. 845–863, 5 ago. 2013.
- MERINO, D.; MALKIN, D. p53 and Hereditary Cancer. In: **Sub-cellular biochemistry**, v. 85p. 1–16, 2014.
- MISHRA, P.; AMBS, S. Metabolic signatures of human breast cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 3, p. e992217, 3 jul. 2015.
- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 2–8, jan. 2013.
- MYRIAD. **myRisk Clinical Handbook**. Myriad Genetic Laboratories, 2014.
- NCBI, **National Center for Biotechnological Information**. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 15 jul. 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Springer, 2009.
- OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. *TP53* Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001008–a001008, 1 jan. 2010.
- OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **The oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361–77, 2004.
- PALMERO, E. I. et al. Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Letters**, v. 261, n. 1, p. 21–25, 8 mar. 2008.
- PASKULIN, D. D. et al. Ancestry of the Brazilian *TP53* c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143262, 30 nov. 2015.
- PEDERSON, H. J. et al. Managing patients at genetic risk of breast cancer. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 83, n. 3, p. 199–206, mar. 2016.
- PETITJEAN, A. et al. *TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2157–2165, 2 abr. 2007.
- PINTO, E. M. et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nature Communications**, v. 6, p. 6302, 6 mar. 2015.

RAMIÃO, N. G. et al. Biomechanical properties of breast tissue, a state-of-the-art review. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 15, n. 5, p. 1307–1323, 9 out. 2016.

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

RICH, T. A. et al. Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. **Journal of surgical oncology**, v. 111, n. 1, p. 66–80, jan. 2015.

SCHNEIDER, A. P. et al. The breast cancer epidemic: 10 facts. **The Linacre quarterly**, v. 81, n. 3, p. 244–77, ago. 2014.

SCHON, O. et al. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. **Journal of molecular biology**, v. 323, n. 3, p. 491–501, 25 out. 2002.

SMITH, M.; MESTER, J.; ENG, C. How to spot heritable breast cancer: A primary care physician's guide. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 81, n. 1, p. 31–40, 1 jan. 2014.

SORRELL, A. D. et al. Tumor protein p53 (*TP53*) testing and Li-Fraumeni syndrome : current status of clinical applications and future directions. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 17, n. 1, p. 31–47, fev. 2013.

SOUSSI, T.; DEHOUCHE, K.; BÈROUD, C. p53 Website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. **Human Mutation**, v. 15, n. 1, p. 105–113, jan. 2000.

SWIETACH, P. et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1638, p. 20130099, 19 mar. 2014.

WALSH, M. F. et al. Genomic Biomarkers for Breast Cancer Risk. v. 882, p. 169–189, 2016.

WEBB, B. A. et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 9, p. 671–677, 11 ago. 2011.

ZHONG, G.-C. et al. Meta-analysis of oral contraceptive use and risks of all-cause and cause-specific death. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. 3, p. 228–233, dez. 2015.

10. ANEXOS

I- Procedimento de Coleta de Amostras

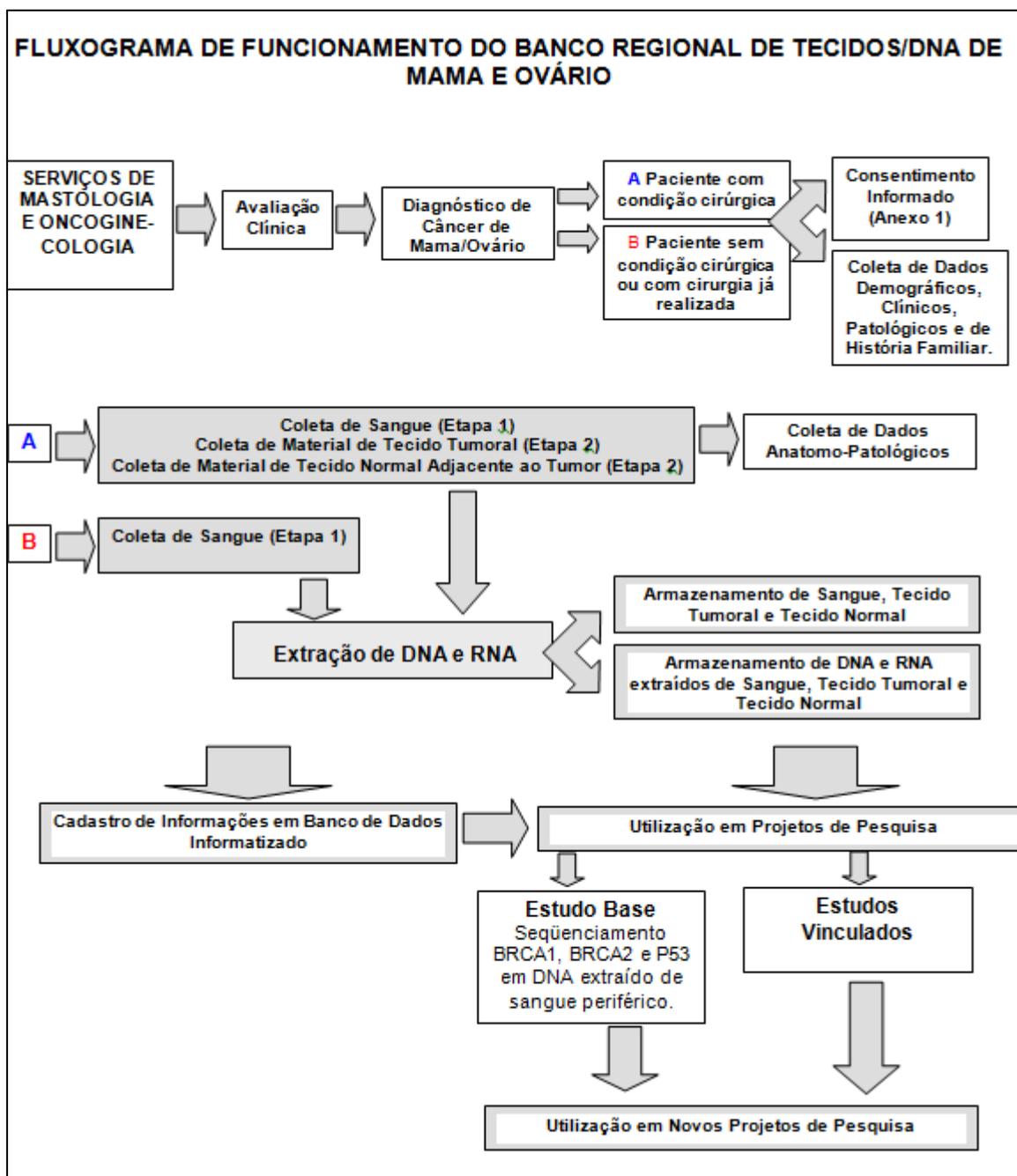


Figura 1a: Fluxograma adotado durante a coleta de material biológico de pacientes com câncer de mama e/ou ovário (retirado do projeto original: Grupo Colaborativo para o Estudo da Genética do Câncer de Mama/Ovário no Rio Grande do Sul: Banco Regional de Tecido/DNA de Mama e Ovário, GPPG: 04-438).

II- Termo de Consentimento Livre e Informado

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Mastologia

Consentimento Informado Banco Regional de Tecidos/DNA de Mama/Ovário - RS

Estamos convidando pessoas com diagnóstico de câncer de mama e/ou câncer de ovário a doar amostras de sangue, de tecido mamário normal (um pequeno fragmento da mama que está sendo retirada pela cirurgia) e de tecido tumoral (um pequeno fragmento do tumor que está sendo retirado pela cirurgia).

Este material será armazenado no Banco de Tecidos/DNA do Serviço de Mastologia do Rio Grande do Sul para futuros estudos sobre fatores genéticos associados ao câncer de mama.

As amostras de tecido mamário normal e de tecido tumoral serão coletadas durante a sua cirurgia, e este procedimento não terá influência sobre a mesma. Os tecidos utilizados são uma parte do tecido que é retirado rotineiramente em cirurgias como a que você irá fazer. A quantidade de sangue doado, cerca de 5 mL, não trará prejuízos à sua saúde.

Todas as dúvidas sobre a coleta e sobre as futuras pesquisas que serão desenvolvidas utilizando o material coletado poderão ser esclarecidas pelos médicos e enfermeiras da equipe cirúrgica que está lhe acompanhando, ou posteriormente, através do telefone 2101.8849 com a Dra. Sandra Segal ou a Dra. Ana Bittelbrunn.

O armazenamento das amostras não implicará em custo adicional, nem terá interferência na definição dos exames e procedimentos necessários ao seu tratamento. O material coletado será armazenado por um período de tempo indeterminado mas, caso você mude de idéia, seu consentimento pode ser retirado a qualquer momento, e neste caso, as suas amostras serão destruídas.

A liberação de amostras identificadas, bem como de resultados para terceiros, só ocorrerão com a sua autorização por escrito.

Em nenhuma hipótese haverá quebra de confidencialidade quanto aos dados coletados no momento de seu cadastramento no Banco Regional de Tecidos/DNA de Mama e Ovário do Rio Grande do Sul.

Sendo assim:

- a) Concordo que minhas amostras sejam armazenadas para serem utilizadas em futuras pesquisas, inclusive as realizadas em outros centros, sobre doenças de mama?
() sim () não
- b) Desejo ser informada sobre os resultados destes estudos? () sim, e estou ciente de que minhas amostras serão identificadas e que serei informada sobre os resultados realizados e consultada sobre o meu interesse específico em saber o resultado de cada um; () não, e estou ciente que minhas amostras não serão identificadas e que não receberei qualquer informação sobre esses estudos.
- c) Caso eu esteja impossibilitada, por qualquer motivo, de receber estes resultados:
() desejo que estes sejam transmitidos a _____.
() não desejo que qualquer pessoa receba os resultados por mim.
- d) Concordo que minhas amostras sejam futuramente utilizadas em pesquisas, inclusive as realizadas em outros centros, não relacionadas à minha doença:
() sim, e estou ciente que apesar de não obter nenhum benefício direto dos resultados destes estudos, os mesmos poderão ser muito importantes para o progresso da medicina.
() não

Declaro que li e compreendi as informações acima e que minhas dúvidas foram esclarecidas por _____ que assina abaixo como responsável pelas informações fornecidas.

Nome: _____

Ass.: _____

_____, ____ de _____ de _____.

Nome do responsável pelas informações fornecidas:

Assinatura do responsável pelas informações fornecidas:

Data: ___/___/___

III- Ficha de Coleta de Dados Demográficos e Clínicos

SERVIÇO DE MASTOLOGIA – BANCO DE TECIDOS/DNA

FICHA DE COLETA DE DADOS

1. DATA	2. PRONTUÁRIO	3. FICHA Nº
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		
4. NOME COMPLETO:		
5. NOME DA FAMÍLIA:		6. Nº FAMÍLIA:
7. ENDEREÇO:		
8. CIDADE:	9. ESTADO:	10. CEP:
11. FONE:		
DADOS DEMOGRÁFICOS		
12. DATA DE NASCIMENTO:		15. ETNIA
13. SEXO		16. NATURALIDADE
14. OCUPAÇÃO ATUAL		
HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA		
17. MENARCA		22. IDADE DO INÍCIO DO USO DE ACO:
18. G _ P _ Ae _ Ap _		23. DURAÇÃO DO USO DE ACO:
19. CAUSA DA NULIPARIDADE:		24. IDADE DA MENOPAUSA:
20. IDADE NO 1º PARTO A TERMO:		25. IDADE DO INÍCIO DO USO DE TRH:
21. TEMPO DE AMAMENTAÇÃO (total meses):		26. DURAÇÃO DO USO DE TRH:
27. HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER (tipo e lateralidade//parentesco//idade do diagnóstico):		
28. HISTÓRIA PREGRESSA DE DOENÇA BENIGNA DE MAMA (QUAL?): (*considerar a lesão de maior risco)		
29. NÚMERO DE BIÓPSIAS DE MAMA PRÉVIAS:		
30. HISTÓRIA PESSOAL DE CÂNCER (OUTROS// idade INÍCIO):		
HISTÓRIA PESSOAL DE CÂNCER DE MAMA = Sim		
31. LOCALIZAÇÃO:		40. IDADE NO DIAGNÓSTICO:
32. DATA DO DIAGNÓSTICO:		41. IDADE NA RECIDIVA:
33. MAMOGRAFIA: DATA- BIRADS -		IMUNO-HISTOQUÍMICA:
34. ECOGRAFIA MAMÁRIA: DATA – BIRADS-		42. RE
35. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA:		43. RP:
36. TAMANHO TUMOR – IMAGEM mm		44. HER2:
MICROMETÁSTASES: Sim () Não ()		45. FISH HER2:
37. TAMANHO DO TUMOR – CLÍNICO mm		46. p53:
38. MÉTODO AMOSTRA:		47. Ki67:
39. AP DIAGNÓSTICO BIÓPSIA		

CIRURGIA (MAMA) DATA:	
48. TÉCNICA: CONGELAÇÃO: () Sim () Não LAUDO: LINFONODO SENTINELA: () Sim () Não LAUDO TRANSOPERATÓRIO: LINFONODO SENTINELA – LAUDO DEFINITVO: 49. AP PEÇA CIRÚRGICA: Tipo Histológico - MENOR MARGEM - mm Grau Histológico Nottingham – Invasão Linfovascular – Doença de Paget – Extenso Componente In Situ – Nº LINFONODOS (total) - Nº LINFONODOS POSITIVOS -	
pT: pN: pM: ESTÁGIO: LOCAL METÁSTASES:	
TRATAMENTO COMPLEMENTARES	
50. QT NEO: não // sim: 1ª linha _____ TOTAL CICLOS: _____ 51. Resposta: Não // Parcial // Total 2ª linha _____ TOTAL CICLOS: _____ Tamanho TU após QT: mm 52. QT ADJ: não // sim: 1ª linha _____ TOTAL CICLOS: _____ 2ª linha _____ TOTAL CICLOS: _____ 53. RXT ADJ: não // sim: _____ 54. HORMONIOTERAPIA ADJ: não // sim: 1ª Esquema _____ 55. OUTROS:	
RECIDIVA DATA:	
56. TOPOGRAFIA: 57: LESÃO ALVO P/ TRATAMENTO: 57. QT PALIAT: não // sim: Esquema _____ Resposta: não // parcial // total 58. RXT PALIAT: não // sim: Esquema _____ Resposta: não // parcial // total 59. HORMONIOTERAPIA PALIAT: não // sim: Esquema _____ Resposta: não // parcial // total	
ACOMPANHAMENTO MASTOLÓGICO	
60. ÚLTIMA MMG: 0-1a // 1-2a // 2-5a // +5ª	61. ÚLTIMA ECO MAMÁRIA: 0-1a // 1-2a // 2-5a // +5a

HEREDOGRAMA

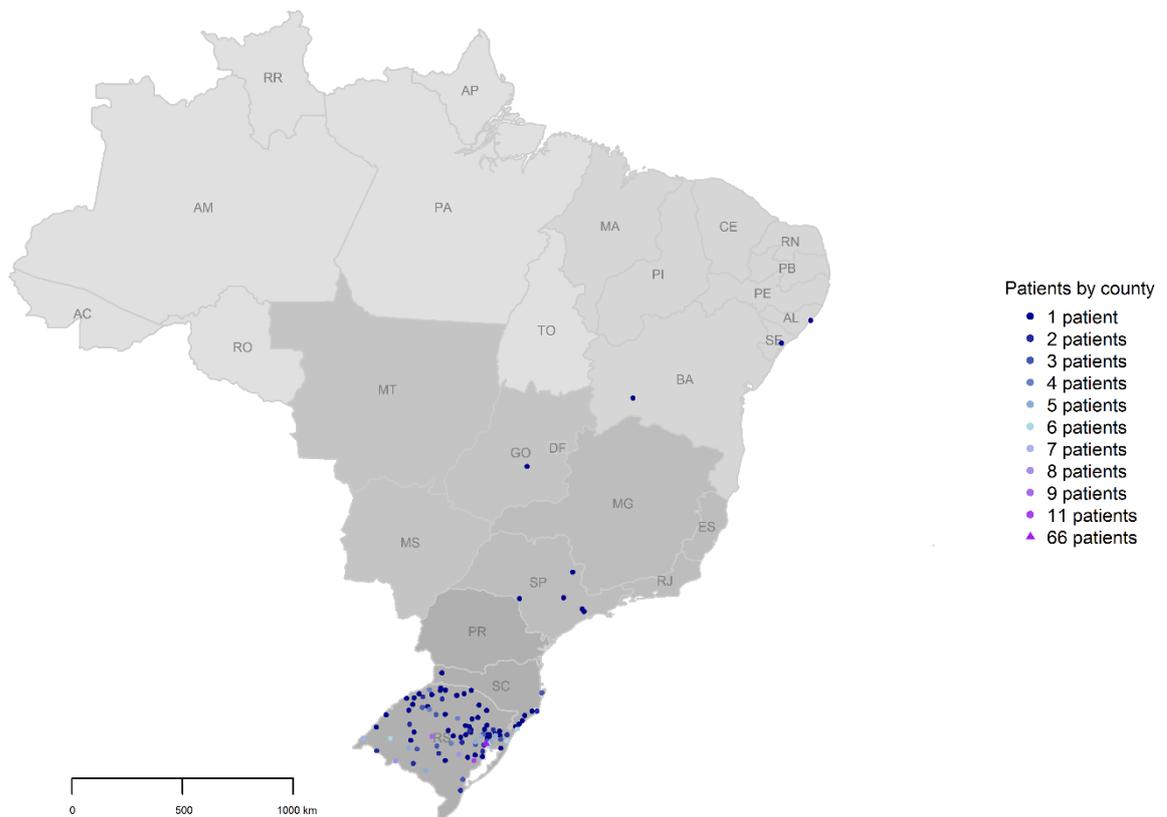
--

11. APÊNDICE

I- Ilustração de Metodologias e Resultados

A)

Distribution of patients in Brazil



B)

Distribution of patients in Rio Grande do Sul

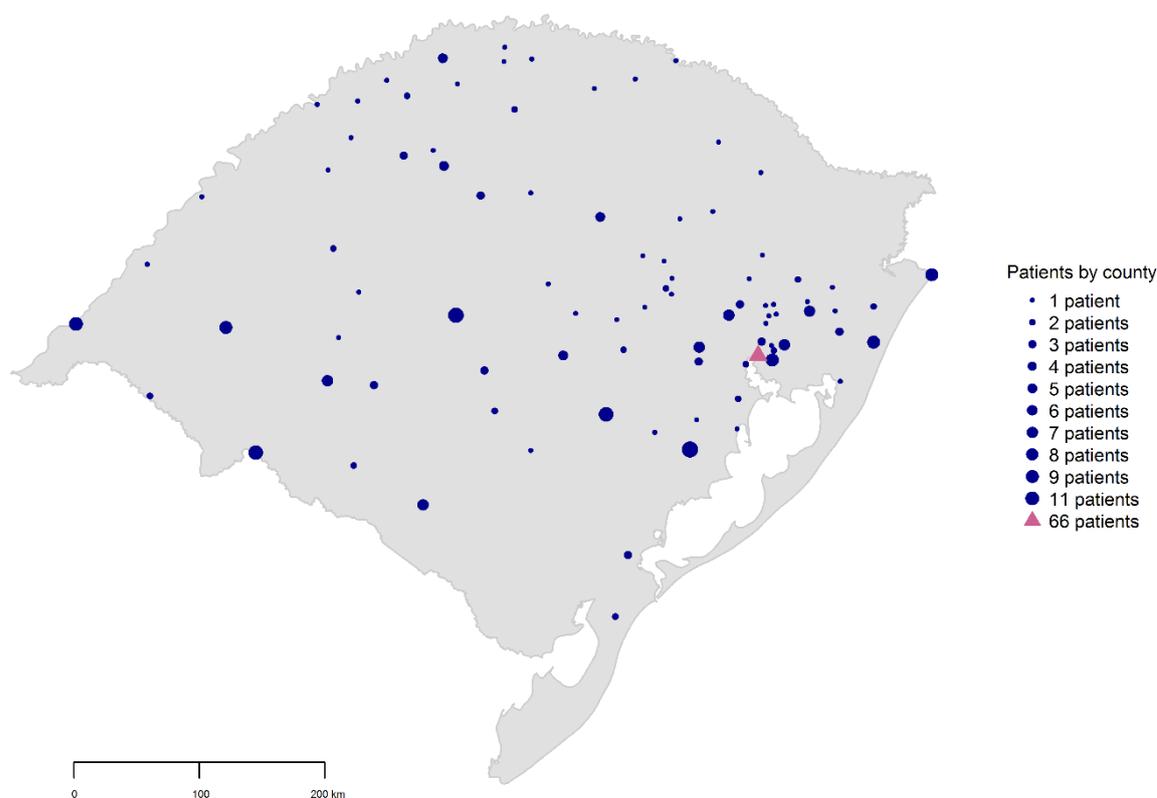


Figura 1b: Distribuição geográfica do local de nascimento dos pacientes envolvidos no estudo.

A) Mapa do Brasil demonstrando a distribuição dos pacientes no território nacional (n=300). 108 municípios tiveram representantes nesta amostragem; 20 pacientes (6,5%) eram provenientes de 18 cidades fora do estado do Rio Grande do Sul (RS), incluindo municípios dos estados de Santa Catarina (9), São Paulo (5), Alagoas (1), Sergipe (1), Bahia (1) e Goiânia (1). Quatro indivíduos declararam naturalidade exterior ao Brasil, sendo um de cada país: Alemanha, Bielorrússia, Portugal e Uruguai. B) Mapa do RS em detalhe: 280 (92,1%) pacientes possuem naturalidade neste estado. A amostragem abrangeu 89 municípios do RS, sendo a maioria da capital Porto Alegre (22%), Camaquã (3,6%), Santa Maria (3,0%), Encruzilhada do Sul (2,6%) e Santana do Livramento (2,6%); o restante possuía 6 ou menos representantes, sendo 45 municípios os com apenas um representante.

OBS: Os mapas foram criados usando os pacotes *mapproj* e *maps* do ambiente R, versão 3.2.3 (R Core Team, 2015) e as coordenadas geográficas dos locais declarados pelos pacientes foram obtidas a partir do Google Maps (google.com.br/maps).

Referência

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

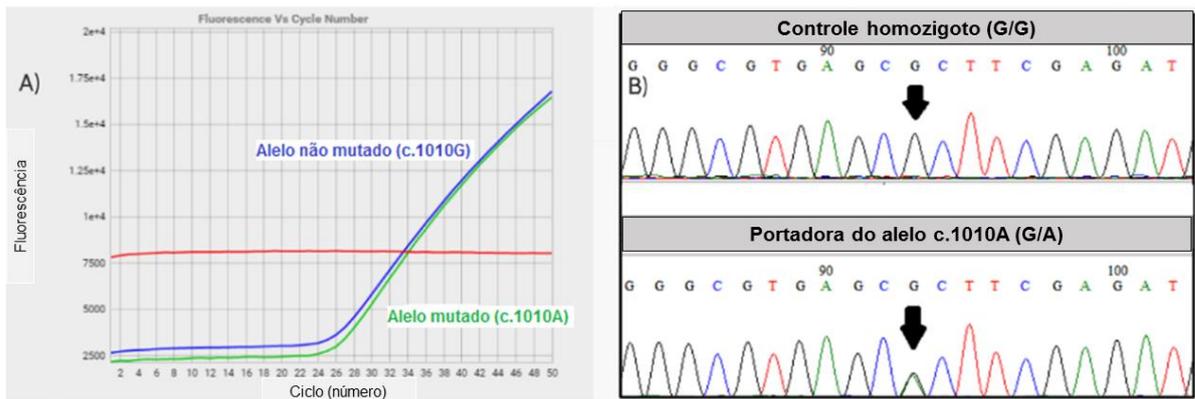


Figura 2b: Resultados da genotipagem na única portadora de *TP53* p.Arg337His. A) Gráfico multicomponente (PCR em Tempo Real utilizando uma sonda comercial); B) Eletroferograma (Sequenciamento de Sanger).

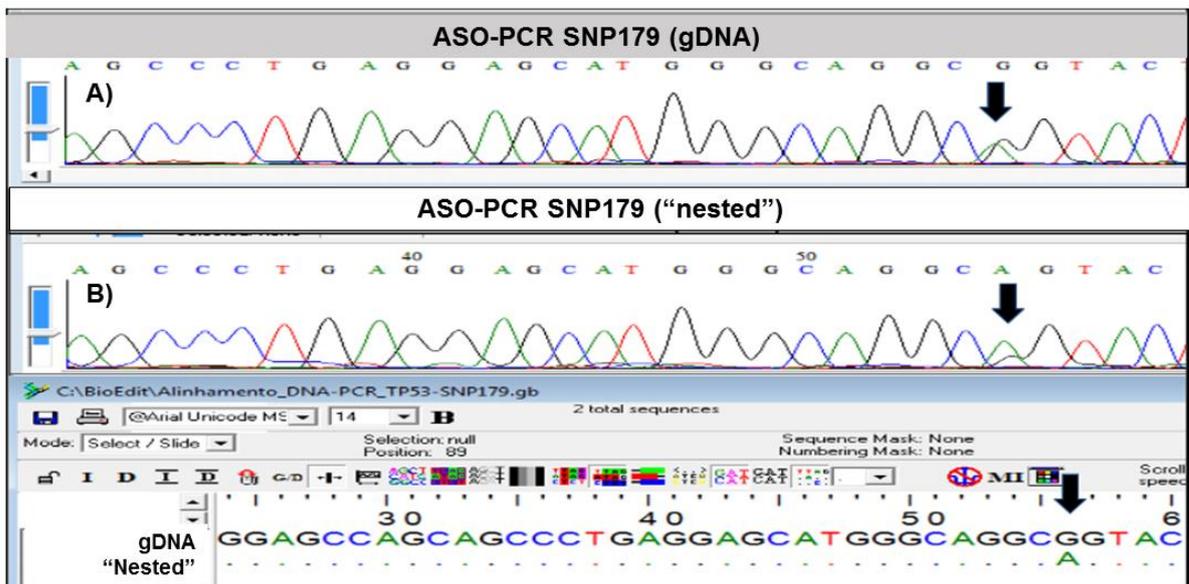


Figura 3b: Resultado da haplotipagem, baseada na técnica de *Allelic-Specific Oligonucleotide PCR* (ASO-PCR) para genotipagem do SNP179 (rs9894946), um polimorfismo em forte desequilíbrio de ligação com a mutação *TP53* p.Arg337His. Dois PCRs são realizados em sequência. O primeiro amplifica uma região de 3.130 pares de bases, que engloba o SNP179 e a mutação *TP53* p.Arg337His (resultado não mostrado). Em seguida, o segundo PCR é realizado com dois tipos de amostras: (A) gDNA, o que resulta em heterozigose na posição do SNP 179 (seta) e demonstra a existência de dois alelos e (B) produto do primeiro PCR (*nested*) que amplifica somente o alelo que contém a mutação e que por isso resulta em homozigose no SNP179 (OBS: uma pequena amplificação cruzada pode acontecer devido à diferença em somente um nucleotídeo nos *primers* utilizados). Protocolo desenvolvido por GARRITANO et al., 2010.

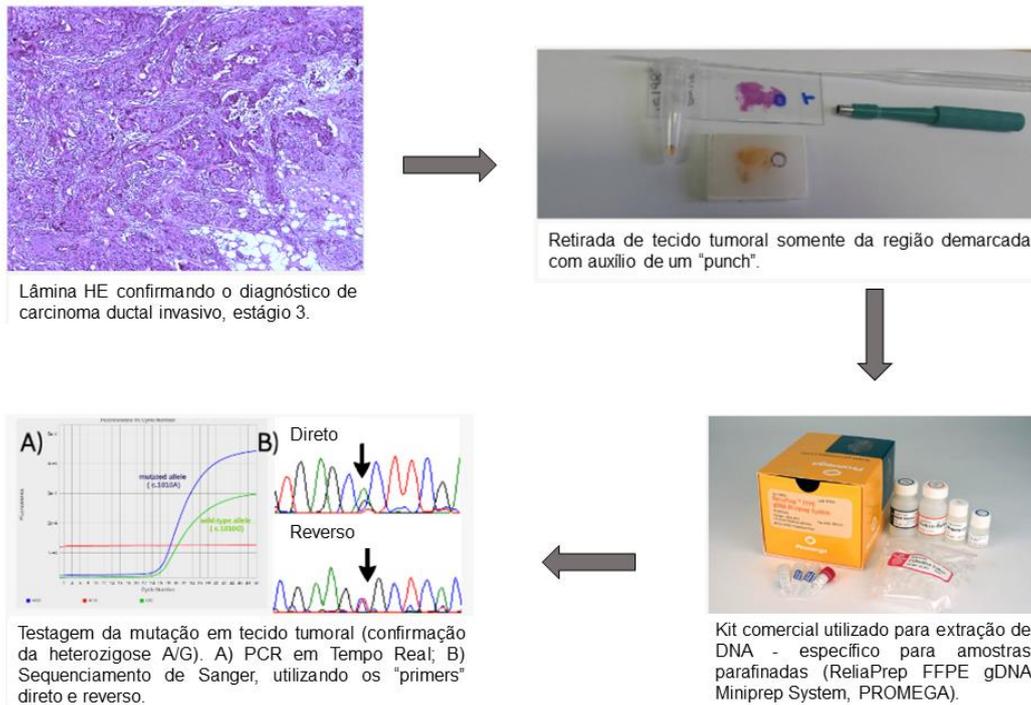


Figura 4b: Metodologia adotada para a extração de DNA proveniente de tumor de mama. O processo se iniciou com a análise de uma lâmina HE, confeccionada a partir de um bloco de parafina contendo a biópsia de tumor de mama da paciente, por uma patologista experiente. Em seguida, uma região contendo somente células tumorais foi delimitada e utilizada para a extração de DNA, a retirada do material parafinado foi realizada com auxílio de um *punch*, um instrumento utilizado para colher amostras de biópsias de pele. A extração de DNA foi feita com um kit comercial específico para amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina - ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega). A testagem molecular envolveu as técnicas de PCR em Tempo Real (sonda customizada), seguida da confirmação da heterozigose por sequenciamento de Sanger com os *primers* direto e reverso.

II- Comparação de dados demográficos e clínicos de pacientes com câncer de mama coletadas em dois hospitais públicos do Rio Grande do Sul

Tabela 1a: Comparação das faixas etárias referentes ao diagnóstico de câncer de mama entre a amostra utilizada neste trabalho (HCPA, n=315) e um grupo de pacientes com câncer de mama coletado no hospital Fêmeina (n=394), os dados deste último local foram cordialmente cedidos pela Prof. Andréa Pires Souto Damin.

Faixa etária	Fêmeina n (%)	HCPA n (%)	p
20-29	6 (1,5)	4 (1,3)	0,225
30-39	42 (10,7)	25 (8,2)	
40-45	56 (14,2)	41 (13,4)	
46-49	41 (10,4)	28 (9,2)	
50-59	121 (30,7)	83 (27,1)	
60-69	84 (21,3)	68 (22,2)	
70-79	39 (9,9)	48 (15,7)	
80-89	5 (1,3)	9 (2,9)	
Sem informação	-	9	
Total	394	315	

Tabela 2a: Comparação de dados demográficos e clínicos entre a amostra utilizada neste trabalho (HCPA, n=315) e um grupo de pacientes com câncer de mama coletado no hospital Fêmeina (n=394), os dados deste último local foram cordialmente cedidos pela Prof. Andréa Pires Souto Damin.

Variável	Categorias	Hospital		p
		Fêmeina n (%)	HCPA n (%)	
Idade ao diagnóstico de câncer de mama¹	<i>Média (desvio padrão, anos)</i>	54,0 (12,4)	56,3 (13,1)	0,229
Idade da menarca²	<i>Antes dos 12 anos</i>	110 (29,6)	52 (19,1)	0,002*
	<i>12 anos ou mais</i>	261 (70,4)	220 (80,9)	
Número de gestações³	<i>Nuligesta</i>	29 (7,6)	31 (10,5)	0,416
	<i>1 gestação</i>	64 (16,8)	48 (16,3)	
	<i>2 ou mais gestações</i>	289 (75,7)	216 (73,2)	
Primeira gestação, idade³	<i>Até 20 anos</i>	143 (41,6)	88 (35,3)	0,312
	<i>21-29 anos</i>	158 (45,9)	133 (53,5)	
	<i>30-34 anos</i>	33 (9,6)	23 (9,2)	
	<i>35 anos ou mais</i>	10 (2,9)	5 (2,0)	
Aborto²	<i>Sim</i>	133 (35,2)	95 (33,2)	0,621
	<i>Não</i>	245 (64,8)	191 (66,8)	
Anticoncepcional, tempo de uso³	<i>Não se aplica</i>	143 (36,6)	81 (27,8)	0,019*
	<i>Até 5 anos</i>	56 (14,3)	60 (20,6)	
	<i>Mais de 5 anos</i>	192 (49,1)	150 (51,6)	
Menopausa²	<i>Sim</i>	238 (61,3)	223 (74,3)	<0,001*

	<i>Não</i>	150 (38,7)	77 (25,7)	
Idade da Menopausa³	<i>Até 45 anos</i>	66 (28,1)	79 (35,7)	0,176
	<i>46-53 anos</i>	146 (62,1)	126 (57,0)	
	<i>Mais de 54 anos</i>	23 (9,8)	16 (7,3)	
Terapia de Reposição Hormonal (TRH)²	<i>Sim</i>	19 (8,0)	47 (21,3)	<0,001*
	<i>Não</i>	218 (92,0)	174 (78,7)	
TRH, tempo de uso³	<i>Até 5 anos</i>	10 (52,6)	29 (61,7)	0,461
	<i>Mais de 5 anos</i>	9 (47,4)	18 (38,3)	
Tipo Histológico³	<i>Carcinoma intraductal</i>	6 (1,5)	15 (5,4)	0,001*
	<i>Carcinoma ductal invasor</i>	360 (91,6)	228 (82,0)	
	<i>Carcinoma lobular in situ</i>	0 (0,0)	2 (0,7)	
	<i>Carcinoma lobular invasor</i>	27 (6,9)	33 (11,9)	
Receptor de Estrogênio²	<i>Positivo</i>	287 (72,8)	194 (72,9)	0,980
	<i>Negativo</i>	107 (27,2)	72 (27,1)	
Receptor de Progesterona²	<i>Positivo</i>	246 (62,4)	161 (63,1)	0,857
	<i>Negativo</i>	148 (37,6)	94 (36,9)	
HER2²	<i>Positivo</i>	65 (16,5)	46 (21,5)	0,131
	<i>Negativo</i>	328 (83,5)	168 (78,5)	
História pessoal de câncer (HPC)²	<i>Sim</i>	18 (4,6)	35 (12,0)	0,001*
	<i>Não</i>	375 (95,4)	255 (88,0)	
HPC, localização do tumor³	<i>Mama</i>	10 (55,4)	12 (34,3)	0,050
	<i>Ovário</i>	1 (5,6)	0 (0,0)	
	<i>Intestino</i>	3 (16,7)	2 (5,7)	
	<i>Rim</i>	1 (5,6)	1 (2,9)	
	<i>Outros</i>	3 (16,7)	20 (57,1)	
História familiar de câncer de mama (HFCM)²	<i>Sim</i>	124 (32,3)	93 (30,8)	0,804

	<i>Não</i>	260 (67,7)	209 (69,2)	
HFCM, Grau de parentesco	<i>Primeiro</i>	62 (52,1)	27 (29,0)	0,001
	<i>Segundo</i>	50 (42,0)	52 (55,9)	
	<i>Primeiro e Segundo</i>	7 (5,9)	14 (15,1)	
HFCM, faixa etária³	<i>Até 40 anos</i>	28 (24,1)	16 (17,2)	<0,001
	<i>41 anos ou mais</i>	85 (73,3)	51 (54,8)	
	<i>Idade ignorada</i>	3 (2,6)	26 (28,0)	
HFCM, indivíduos afetados²	<i>1 familiar</i>	85 (75,9)	62 (67,7)	0,144
	<i>Mais de 1 familiar</i>	27 (24,1)	31 (33,3)	
História familiar de outros cânceres em parentes de primeiro grau (HFOC)²	<i>Sim</i>	104 (27,4)	106 (36,2)	0,014*
	<i>Não</i>	276 (72,6)	187 (63,8)	
HFOC, localização dos tumores³	<i>Ovário</i>	3 (2,9)	4 (3,8)	0,337
	<i>Intestino</i>	16 (15,4)	11 (10,6)	
	<i>Outra</i>	85 (81,7)	89 (85,6)	

¹ Teste t para duas amostras independentes (comparação de médias).

² Teste qui-quadrado, valor de p utilizado: teste exato de Fisher (variáveis com 2 categorias - tabela 2X2).

³ Teste qui-quadrado, valor de p utilizado: qui-quadrado (variáveis com mais de 2 categorias)

* Valor de $p > 0,05$, considerado estatisticamente significativo.

As comparações entre os dois centros, Hospital Fêmina (HFe) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), foram realizadas em relação a variáveis que apresentam alguma relação com o desenvolvimento de câncer de mama (como já apresentado na revisão bibliográfica deste trabalho – páginas 5-8) ou que se constituem em indícios de câncer de mama hereditário. No total, 709 pacientes foram incluídas nesta análise (Fêmina - 394; HCPA-315), porém, em algumas categorias as informações não estavam disponíveis para o total de pacientes.

A coleta de amostras no HCPA foi realizada predominantemente entre os anos de 2007-2009 (84,4%). Já no Hospital Fêmina, ocorreu principalmente entre os anos de 2010-2014 (85,7%). A média de idade ao diagnóstico de câncer de mama não diferiu entre os dois centros. Além da idade ao diagnóstico de CM, as variáveis abaixo foram avaliadas.

OBS: Os termos “maior” e “menor” surgem a partir da comparação entre os dois centros e foram determinados através da análise de resíduos. Serão destacadas apenas as categorias que apresentaram diferenças significativas ao serem comparadas (indicadas em negrito na tabela).

História gineco-obstétrica

- Idade da menarca: um número maior de pacientes do HFe relatou menarca antes dos 12 anos.
- Número de gestações: não houve diferença entre os dois centros.
- Idade da primeira gestação: não houve diferença entre os dois centros.
- Aborto: não houve diferença entre os dois centros.
- Tempo de uso de anticoncepcionais: Uma proporção maior de mulheres que nunca havia feito uso de anticoncepcionais foi observada no HFe. Já no HCPA, observou-se uma maior porcentagem de pacientes que usaram anticoncepcionais por um período de até 5 anos.
- Menopausa: uma proporção maior de mulheres do HCPA já estava em menopausa ao receber o diagnóstico de CM.
- Idade da menopausa: não houve diferença entre os dois centros.
- Terapia de reposição hormonal: um maior número de mulheres do HCPA utilizou TRH.

- Tempo de uso de TRH: não houve diferença entre os dois centros.

Informações referentes ao câncer de mama

- Tipo histológico: o HCPA apresentou proporções mais distribuídas ao longo das categorias histológicas de tumor de mama. O carcinoma ductal invasor foi o tipo mais frequente em ambos os centros, porém, no HFe o número de pacientes com este tipo histológico foi proporcionalmente maior. No HCPA, a porcentagem de tumores do tipo carcinoma lobular invasor e carcinoma intraductal foi maior.
- Imunoistoquímica: não houve diferença entre os centros quanto a proporção de resultados positivos/negativos referentes aos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e a HER2.

História de Câncer

- História pessoal: mulheres atendidas no HCPA relataram história pessoal de câncer com maior frequência.
- Localização do tumor: o valor ficou no limite de significância, pode-se perceber uma tendência a uma maior proporção de pacientes provenientes do HCPA com tumores prévios em outras locais, que não ovário, intestino e rim.
- História familiar de câncer de mama: não houve diferença entre os dois centros.
- Grau de parentesco: O HFe apresentou um maior número de pacientes que possuíam familiares de primeiro grau com câncer de mama. Já o HCPA, uma maior proporção de parentes de segundo e de primeiro e segundo grau com história de CM.
- Faixa etária dos familiares: a diferença observada entre os dois centros deve ser analisada com cautela, isto porque, no HCPA, não se sabe a maior parte das idades em que os familiares foram diagnosticados com CM.
- Número de indivíduos afetados: não houve diferença entre os dois centros.
- História familiar de outros cânceres em parentes de primeiro grau: pacientes do HCPA declararam a ocorrência de outros tumores em familiares de primeiro grau com maior frequência.
- Localização: não houve diferença entre os dois centros.

Considerações finais

A análise de dados demográficos e clínicos de pacientes com câncer de mama pode auxiliar no entendimento de fatores relacionados ao desenvolvimento desta neoplasia. A comparação entre dados obtidos em dois grandes centros de referência em saúde do Rio Grande do Sul, Hospital Fêmina e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pode contribuir para a construção de perfis de pacientes atendidas em hospitais públicos, via SUS (Sistema Único de Saúde), neste estado. Apesar de a maioria das variáveis não diferir entre os dois centros, cada hospital apresentou diferenças que indicam que o perfil destas pacientes não é completamente homogêneo, mesmo a uma pequena distância geográfica.

III- Outras atividades

Participação em projetos paralelos

1. Mucopolissacaridose IVA do Brasil: Análise Genético-Molecular de uma Amostra de Pacientes, Estudo de Fatores Epigenéticos e Caracterização de um Possível *Cluster* Geográfico da Doença.

2. Padronização de técnicas para análise de mutações com importância clínica do gene *EGFR* em amostras de câncer de pulmão de células não-pequenas (Medicina Personalizada).

Apresentação de trabalhos relacionados em Eventos (como primeira autora)

35ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2015)

- Pôster: Implementação de um Protocolo de Análise Molecular para o Gene *EGFR* em Amostras de Tecido Fixado em Formalina e Embebido em Parafina

XXVIII Congresso Brasileiro de Genética Médica (2016)

- Pôster: Estimativa da Frequência da Mutação Germinativa *TP53* p.Arg337his em uma Série de Pacientes com Câncer de Mama do Estado do Rio Grande do Sul.

- Pôster: Análise Molecular do Gene *EGFR* em Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas sob a Perspectiva da Medicina Personalizada.

36ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2016)

- Pôster: Mutação *TP53* p.Arg337His e câncer de mama: relato clínico e molecular de uma portadora.

- Pôster: Utilização das metodologias de Sequenciamento de Sanger, castPCR e Sequenciamento Massivo em Paralelo no diagnóstico de mutações com relevância clínica em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas.

IV- Publicações durante o período do Mestrado

1. Coloração da pelagem canina: integrando conceitos básicos de genética clássica.

Eriza Hahn e Marion Schiengold

Artigo publicado na Revista Genética na Escola (março de 2017).

2. Association of *HLA-G* 3' untranslated region polymorphisms and haplotypes with severe sepsis

Eriza Cristina Hahn, Francis Maria Bão Zambra, Anselmo Jiro Kamada, Francieli Delongui, Edna Maria Vissoci Reiche, José Artur Bogo Chies

Artigo submetido a periódico de circulação internacional (dezembro de 2016).